

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS CONVENCIONAIS E
APLICAÇÕES ALTERNATIVAS PARA PREVENIR A BIODETERIORAÇÃO EM
PATRIMÓNIO CULTURAL**

Ana Josina Moreira Duarte Fonseca

Dissertação de Mestrado em Conservação e Restauro

Área de especialização: Pedra

Orientador Científico: Professor Doutor Fernando Pina

Co-orientador científico: Professora Doutora Maria Filomena Macedo

Co-orientador Científico: Doutor Nuno Leal

Monte da Caparica, 2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Fernando Jorge da Silva Pina, orientador deste trabalho, pela disponibilidade para colaborar comigo, pela apresentação e sugestão do tema, e pelos ensinamentos e esclarecimentos prestados ao longo do meu trabalho.

À Professora Doutora Maria Filomena Macedo, co-orientadora deste trabalho, pelo acompanhamento regular do meu trabalho, pelas sugestões dadas e pelo apoio que sempre demonstrou.

Ao Doutor Nuno Leal, co-orientador deste trabalho, pela disponibilidade, quer para o esclarecimento das mais variadas dúvidas, quer pelas sugestões oportunas e conselhos úteis.

Ao Departamento de Conservação e Restauro e ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Ao Departamento de Ciências da Terra da FCT-UNL pela cedência do espaço para a incubação das amostras

À *Parques de Sintra – Monte da Lua*, em particular ao Arq. José Maria de Carvalho e ao Dr. José Carneiro pela oportunidade de realizar o meu trabalho experimental neste maravilhoso monumento que é o Palácio Nacional da Pena

Ao *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia de Sevilla - Consejo Superior de Investigaciones Cientificas*, projecto CSIC-FCT- 2007PT0041 , em particular à Dr.^a Ana Miller, Dr.^a Leonila Laiz, Dr.^a Anna Romanowska-Deskins e ao Doutor Cesareo Saiz-Jimenez pela disponibilidade na realização das análises por métodos de biologia molecular.

Às firmas *Areipor* e *Soarvamil* pela cedência das areias utilizadas no fabrico das argamassas.

Ao Sr. Rui Soares da empresa *PEDRAMALBA* pelo esclarecimento do método de fabrico das argamassas

Ao *laboratoires Anios* pela cedência do biocida Anios D.D.S.H.

Às minhas colegas Isabel Ferreira e Mathilda Larsson pela ajuda e apoio no decorrer deste trabalho.

À minha família, namorado e amigos agradeço o apoio e amizade.

À minha mãe, um especial agradecimento pelo carinho, compreensão e incentivo prestado ao longo da minha vida.

Obrigado a todos.

Em resultado do trabalho desta tese foi submetido um pedido provisório de patente (Título: Aplicação de um composto fotocatalisador em materiais de construção para prevenir, evitar e/ou eliminar a biodeterioração e respectivos métodos de preparação; Autores: Ana Josina Fonseca; Mathilda Larsson; Nuno Leal; Maria Filomena Macedo e Fernando Pina)

Do presente trabalho resultou também uma apresentação oral que será efectuada na conferência The 2nd European Students Conference on Objects Conservation a realizar na Helsinki Metropolia University of Applied Sciences Faculty of Culture and Creative Industries de 1 a 3 de Outubro de 2009.

Índice

Resumo	- 3 -
Introdução	4
1.1 Objectivos da investigação	4
1.2 Estado Actual dos Conhecimentos	4
1.2.1 Biodeterioração dos materiais de construção.....	4
1.2.2 – Métodos convencionais de controlo da biodeterioração.....	5
1.3 – Exploração de métodos alternativos para o controlo da biodeterioração.....	7
1.3.1 - Processo fotocatalítico dos semicondutores.....	7
1.3.2 - O dióxido de titânio (TiO ₂) como fotocatalisador.....	8
2. Materiais e métodos.....	10
2.1 Produtos químicos seleccionados.....	10
2.2 Materiais de construção seleccionados.....	10
2.3 - Metodologia de aplicação dos tratamentos.....	11
2.3.1- Testes em laboratório	11
2.3.2- Testes <i>in situ</i> aplicados em património cultural.....	12
2.4 - Caracterização do TiO ₂ (P25-Degussa) puro e dopado com Fe ⁺³	13
2.5 Material Biológico seleccionado.....	14
2.5.1 - Inoculação e inubação dos provetes com microrganismos fotossintéticos.....	14
2.6 Avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados	14
2.6.2 – Caracterização Colorimétrica.....	15
3.Resultados e Discussão.....	16
3.1- Identificação da comunidade biológica presente nas paredes do Palácio da Pena.....	16
3.2 – Caracterização do TiO ₂ (P25 – Degussa) puro e dopado com Fe ⁺³	16
3.2.1 – Espectroscopia de Raman.....	16
3.2.2 – Microscopia electrónica de varrimento (SEM)	17
3.2.3 – Caracterização das propriedades dos filmes de TiO ₂ , puros e dopados com Fe.	18
3.3 – Avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados em laboratório	18
3.3.1 – Quantificação da clorofila, determinada por espectrofluorimetria com fibra óptica	18
3.3.2- Quantificação da clorofila <i>a</i> , determinada pelo método de extracção	21
3.4– Avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados <i>in situ</i> em património cultural	25
3.4.1 – Caracterização colorimétrica	25
4. Conclusões	27
5-Perspectivas Futuras.....	27
Anexos	30

Resumo

Recentemente, o desenvolvimento de métodos eficazes para o controlo da biodeterioração do património cultural tem chamado a atenção de investigadores na área da Conservação e Restauro. É neste contexto que surge esta investigação que tem como objectivo principal a avaliação e comparação da eficácia de tratamentos químicos convencionais e aplicações alternativas de modo a determinar a melhor forma de prevenir a biodeterioração dos materiais.

Foram testados dois biocidas de largo espectro, o Biotin T[®], frequentemente utilizado na limpeza do património cultural pétreo, e o Anios D.D.S.H, desinfectante utilizado em âmbito hospitalar, nunca antes aplicado a património cultural. Ambos os produtos são derivados de sais de amónia quaternária. Como produto alternativo aos biocidas, seleccionou-se o dióxido de titânio (TiO₂), sob a forma de anatase (P25 da Degussa).

O TiO₂ (anatase) é um poderoso agente redutor e oxidante, que quando activado pela radiação UV, consegue degradar a matéria orgânica através de reacções redox com algumas moléculas do meio ambiente (H₂O e O₂). Desta forma, as propriedades fotocatalíticas e super-hidrofílicas deste semiconductor possibilitam conferir aos materiais de construção excelentes propriedades de auto-limpeza – os chamados “self-cleaning materials”, que, inibem o crescimento de microrganismos e mantêm os materiais constantemente limpos. Além disso, o facto de o TiO₂ não ser um composto tóxico constitui *a priori* uma boa alternativa aos produtos biocidas convencionais.

A avaliação e comparação da eficácia dos tratamentos foi estudada quer em laboratório, através da inoculação de microrganismos fotossintéticos em provetes de argamassas, quer *in situ*, através da aplicação de soluções aquosas dos três produtos em património cultural edificado, no Palácio Nacional da Pena, em Sintra.

Nos testes laboratoriais, o TiO₂ foi aplicado aos provetes por diferentes metodologias. O processo de dopagem do TiO₂ com o Fe⁺³ foi também testado com o objectivo de desviar a sua acção fotocatalítica da gama espectral UV para a gama de luz visível, estendendo assim a sua performance. O TiO₂ puro e dopado foi caracterizado por diferentes técnicas de análise, nomeadamente: Espectroscopia de Raman, SEM-EDX e Espectroscopia UV-VIS de Reflectância difusa.

Em laboratório a metodologia de avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados foi realizada da seguinte forma: 1) Aplicação do TiO₂ durante o processo de fabrico dos provetes de argamassa; 2) Inoculação dos provetes com uma cultura líquida de microrganismos fotossintéticos; 3) Incubação dos provetes em ambiente exterior durante um período de 4 meses; 4) Monitorização do crescimento biológico através de técnicas de quantificação da clorofila *a*; 5) Aplicação dos 2 biocidas (Anios D.D.S.H e Biotin T) após o crescimento dos microrganismos; 6) Nova determinação do crescimento biológico nos provetes onde se aplicaram os biocidas.

Nos testes realizados *in situ* em património cultural, a avaliação da eficácia dos tratamentos foi realizada através de medições colorimétricas segundo o modelo CIELAB.

Após a avaliação da eficácia dos tratamentos, em laboratório e *in situ*, conclui-se que a aplicação do TiO₂ constitui uma excelente alternativa à aplicação de biocidas.

Palavras-chave: Prevenção da biodeterioração; Fotoquímica; Fotodegradação; Materiais Inteligentes

Introdução

1.1 Objectivos da investigação

O objectivo principal desta investigação é o estudo e a comparação de métodos químicos convencionais e métodos alternativos para o controlo da biodeterioração em argamassas, fenómeno que constitui um dos principais problemas para a manutenção e conservação do património cultural edificado.

Para atingir este objectivo, recorreu-se à seguinte metodologia:

- 1- Selecção dos produtos químicos a aplicar nos tratamentos: dois biocidas (Anios D.D.S.H e Biotin T) e um fotocatalisador, o dióxido de titânio (TiO_2).
- 2- Avaliação da actividade anti-microbiana dos três tratamentos em argamassas, quer em laboratório, através da inoculação de provetes com microrganismos fotossintéticos, quer *in situ*, aplicando os tratamentos, em solução, em duas paredes do Palácio Nacional da Pena.
- 3- Avaliação e comparação da acção dos tratamentos através de diversas técnicas analíticas: quantificação da clorofila *a*, através do método espectrofluorimétrico e através do método de extracção, e medições colorimétricas.
- 4- Selecção do tratamento mais eficaz na prevenção da biodeterioração de argamassas

1.2 Estado Actual dos Conhecimentos

1.2.1 Biodeterioração dos materiais de construção

Os materiais de construção utilizados em património cultural edificado, sejam materiais pétreos ou materiais artificiais, estão sujeitos a diversos factores de alteração, tais como factores físicos, químicos e biológicos que, em conjunto, afectam a sua durabilidade.

Esta investigação foca-se essencialmente na importância do decaimento biológico dos materiais de construção utilizados em património cultural edificado, processo este que, nos últimos anos, representa uma preocupação séria para a manutenção e conservação da herança cultural, uma vez que se estima que aproximadamente 30% da alteração visível em materiais de construção seja devida a factores biológicos [1].

Os biofilmes presentes nas superfícies exteriores do património cultural edificado constituem um vasto ecossistema, resultante de uma sucessão ecológica estabelecida ao longo de vários anos. Estes microrganismos (fungos, bactérias, líquenes, microalgas e cianobactérias) desempenham um papel fundamental na deterioração de vários monumentos e edifícios históricos [2]. Contudo devido ao seu carácter fotoautotrófico e à sua elevada capacidade de sobrevivência em ambientes inóspitos, os microrganismos fotossintéticos, como as microalgas verdes (Chlorophyceae), as cianobactérias (Cyanophyceae), são os que mais ocorrem nas superfícies expostas do património cultural, provocando uma severa biodeterioração [3, 4]. Os microrganismos fotossintéticos são responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento da sucessão ecológica que os precede pois o seu carácter autotrófico permite que produzam uma biomassa orgânica (derivada da sua actividade metabólica) que serve de alimento aos organismos heterotróficos (por exemplo, fungos), promovendo assim o desenvolvimento de uma biocenose mais complexa [3, 5,6].

Em todos os tipos de substratos, existem espaços físicos preferidos pelos organismos fotossintéticos. Geralmente estes espaços são caracterizados por conterem uma elevada capacidade de retenção de água e por serem zonas protegidas da radiação solar directa, mas com luz suficiente para que possam realizar a fotossíntese (buracos, fissuras, poros). Os biofilmes produzidos por estes microrganismos são constituídos por uma matriz orgânica de polímeros extracelulares (Extracellular Polymeric Substances - EPS), que, por um lado, facilita a adesão ao substrato e, por outro, tem a capacidade de absorver água e retê-la durante um longo período de

tempo, tornando-os resistentes a situações de desidratação e exposição a radiação solar intensa [4, 7]. Normalmente, os EPS representam cerca de 50-90% da totalidade da matéria orgânica presente nos biofilmes [8]. A acção destes microrganismos fotossintéticos conduz a alterações cromáticas e alterações das propriedades físicas e químicas do substrato que, em conjunto, aceleram a degradação biogénica do material [5, 9]. De um ponto de vista estético, a presença de patinas coloridas e de incrustações provocadas pela acção biogénica desfigura o aspecto original dos monumentos, o que coloca em risco o seu valor cultural.

A biodeterioração dos materiais é devida a processos biogeoquímicos e biogeofísicos que actuam simultaneamente. [7]. Os processos biogeoquímicos envolvem a alteração das propriedades intrínsecas do substrato, através da acção química dos microrganismos. Esta alteração pode dever-se, por um lado, a acções dos próprios microrganismos, que utilizam o substrato como fonte de nutrientes e, por outro lado, à sua actividade metabólica [7, 9]. Os microrganismos fotossintéticos conseguem obter alguns dos nutrientes necessários para o seu metabolismo (Ca, Al, Fe, K) através da biossolubilização de minerais presentes nos materiais de construção. Este processo denominado biocorrosão, envolve a produção de ácidos orgânicos derivados da acção metabólica dos microrganismos. A biocorrosão é dos processos biogeoquímicos mais bem conhecidos, sendo um dos mais nefastos para os materiais [6, 10]. Os efeitos biogeoquímicos da acção biológica são facilmente visíveis através da presença de pigmentos e dos EPS, que influenciam a cor e a integridade estrutural da superfície.

A formação de filmes biogénicos no interior dos poros do substrato induz stress mecânico devido ao facto de estes sofrerem alterações de volume consoante existe mais ou menos água, conduzindo a alterações no tamanho dos poros, da sua distribuição e do sistema de circulação da água, provocando fenómenos de desagregação do substrato, o que acelera a deterioração biogeofísica dos materiais [11, 12].

O conhecimento da biodiversidade dos principais microrganismos colonizadores do património cultural edificado assume-se, assim, como uma etapa fundamental para compreender os mecanismos envolvidos na biodeterioração dos materiais e, conseqüentemente, para propor tratamentos de conservação eficazes e adequados a cada tipo de material. A maior parte dos estudos relativos à identificação da biocenose fotossintética ocorrente em património cultural edificado em pedra, localizado na Bacia Mediterrânica, refere a existência de uma elevada biodiversidade, no entanto podemos afirmar que a maioria das microalgas verdes pertence aos géneros *Chlorella* e *Stichococcus* [2, 5, 13], enquanto que as cianobactérias mais frequentes pertencem aos géneros *Gleocapsa*, *Phormidium* e *Chroococcus* [5, 13-16].

1.2.2 – Métodos convencionais de controlo da biodeterioração

A eficácia dos tratamentos que evitam a biodeterioração depende dos produtos escolhidos e dos métodos aplicados. Normalmente, de entre todos os métodos de intervenção (mecânicos, físicos, biológicos, bioquímicos e químicos), a utilização de métodos químicos, como a aplicação de biocidas, tem sido dos métodos mais usados em tratamentos de conservação, nomeadamente de edifícios históricos e monumentos [17]. Os biocidas são produtos químicos que inibem e/ou destroem a actividade metabólica dos microrganismos, interferindo com as suas funções vitais, como por exemplo a fotossíntese ou a respiração [15, 18]. Contudo, a escolha do biocida ideal é uma tarefa difícil, pois requer uma profunda análise do biocida, tendo em conta a sua natureza química (orgânica ou inorgânica), tipo de microrganismos a eliminar (algicida, fungicida, bactericida), o seu mecanismo de acção e tipo de formulação (pó, líquido, gás). Relativamente ao mecanismo de acção, os biocidas podem ser classificados como: electrofílicamente activos ou activos ao nível da membrana ou compostos quelantes [8]. Os biocidas activos ao nível da membrana ou quelantes incluem os seguintes compostos: álcoois, fenóis, ácidos salicilânidas, dibenzamidas, sais de amónio, entre outros. Estes compostos actuam inicialmente por adsorver a parede celular dos microrganismos. Este processo de adsorção provoca alterações na membrana exterior e ao longo da parede

celular, que vai perdendo a sua integridade, permitindo que as moléculas dos produtos biocidas cheguem à membrana citoplasmática, onde actuam de forma letal [8]. Os biocidas classificados como electrofilicamente activos representam a maior parte dos biocidas actualmente usados, contando-se entre eles os aldeídos e os compostos organo-metálicos. O efeito anti-microbiano destes produtos advém do facto de estes compostos procurarem substratos que contenham uma elevada densidade electrónica, como os componentes nucleofílicos da célula microbiana [8].

O conhecimento da natureza química do biocida a aplicar é extremamente importante, sobretudo devido às interferências que o produto biocida possa ter com o substrato. Quando mal seleccionados, os biocidas poderão induzir reacções químicas indesejáveis no substrato e alterações cromáticas, como amarelecimento ou branqueamento, modificações no brilho ou na diafaneidade da superfície [18]. Contudo, o grau de interferência do produto com o substrato relaciona-se também com a sua forma de aplicação. Os produtos podem ser aplicados por diferentes métodos: *spray*, pincel/escovas, injeção, fumigação, pó ou granulado. A escolha do método de aplicação depende da concentração que se queira aplicar, do tempo de contacto, da natureza química do produto, das condições atmosféricas no momento de aplicação e, por último, mas não menos importante, das propriedades químicas e físicas do substrato e das condições de conservação do mesmo. A aplicação de soluções diluídas de biocidas através de pincel ou *spray* é a forma mais comum de aplicação em património cultural edificado [7, 17]. Assim, antes de qualquer aplicação de um produto químico, é necessário garantir a compatibilidade química e física entre o biocida e o substrato. Se não existir nenhuma informação relativa ao produto, é fundamental recorrer inicialmente a testes laboratoriais, utilizando provetes do mesmo tipo de substrato, simulando as mesmas condições a que o material se encontra sujeito [7].

A análise da natureza química do produto biocida facilitará o cumprimento dos principais requisitos a ter em conta: a eficácia do produto na eliminação dos microrganismos, a interferência com o substrato, os riscos para o meio ambiente e saúde pública (toxicidade) e os efeitos a longo prazo [19]. A eficiência do biocida é definida tendo em conta três parâmetros: a dose do produto (quantidade de produto por área de aplicação), o espectro de acção e a persistência do produto. O biocida ideal deverá actuar com eficácia no momento desejado e ser o menos tóxico possível. Um produto de longa persistência, aplicado em alta concentração, será mais eficaz contra os microrganismos a eliminar, mas pode causar sérios danos ao meio ambiente e à saúde pública.

Analisando o mercado actual, podemos constatar que os produtos biocidas mais frequentemente aplicados são baseados em produtos antigos, que foram introduzidos no mercado há décadas. Normalmente, estes biocidas são convencionalmente formulados para uso na agricultura e na medicina, existindo poucos registos ou recomendações sobre formulações comerciais específicas para uso em conservação do património cultural edificado, sendo a compatibilidade biocida/substrato raramente considerada. Contudo, após uma pesquisa bibliográfica sobre biocidas comerciais de largo espectro mais utilizados em tratamentos de conservação em património cultural edificado, foi possível concluir que os biocidas considerados mais eficientes e mais adequados são os compostos de amónia quaternária [7, 8, 20-22]. Estes compostos de amónia quaternária (QACs) são agentes surfactantes catiónicos que exibem elevada actividade e estabilidade a longo prazo, mesmo quando aplicados em baixas concentrações. Segundo certos autores, estes produtos exibem baixa interferência com os minerais dos substratos [15]. Os QAC's são biocidas de largo espectro: algicidas, bactericidas e fungicidas. Como biocidas de superfície activa catiónica são classificados, segundo o mecanismo de acção, como activos ao nível da membrana. Estes compostos são atraídos pela superfície carregada negativamente da célula do microrganismo. A parede celular vai perdendo a sua função protectora e os agentes activos do biocida chegam à membrana citoplasmática, destruindo a sua integridade estrutural. A actividade antimicrobiana dos compostos de

amónia quaternários depende da sua estrutura e tamanho (Fig. 1). Um grupo alquilo de cadeia longa, com 12 a 16 átomos de carbono é essencial para a sua eficácia [8].

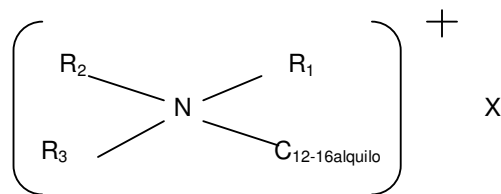


Fig. 1- Estrutura química de um composto de amónia quaternário; onde R representa um grupo alquilo e X um halogéneo (Br, I, Cl) Adaptado de [8]

1.3 – Exploração de métodos alternativos para o controlo da biodeterioração dos materiais de construção

Nos últimos anos, a aplicação de biocidas tem sido alvo de um julgamento depreciativo. Por um lado, porque estes produtos não promovem uma protecção a longo prazo contra a biodeterioração, muitas vezes devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos, tendo que ser novamente reaplicados [23]. Por outro lado porque muitos destes produtos podem induzir problemas ambientais e de saúde pública, devido à toxicidade e sobredosagem [17].

Desta forma, face à importância da conservação do património cultural, surge a necessidade de uma política de sustentabilidade do património que seja auto-sustentável e compatível com o meio ambiente.

A exigência de aplicações científicas cada vez mais sofisticadas que acompanhem o desenvolvimento tecnológico actual levou a que esta investigação se focasse no desenvolvimento de materiais “self-cleaning” que exibam propriedades anti-microbianas e super-hidrofílicas e que sejam simultaneamente compatíveis com o meio ambiente e com o substrato. Uma das formas estudadas neste trabalho para conseguir o desenvolvimento deste tipo de materiais, partiu dos chamados Processos Avançados de Oxidação (PAO's), em particular da fotocatalise heterogénea dos semicondutores eficiente na degradação da matéria orgânica. Apresenta-se em seguida a descrição detalhada do processo fotocatalítico destes semicondutores.

1.3.1 - Processo fotocatalítico dos semicondutores

Os semicondutores são caracterizados por possuírem duas bandas de energia distintas: uma banda de valência de baixa energia e uma banda de condução de alta energia. A fotocatalise de um semicondutor é activada através da radiação UV. A absorção de fótons de energia igual ou superior ao hiato de energia, ($E \geq E_{\text{bandgap}}$), promove um electrão (e^-) da banda de valência para o estado excitado (banda de condução), gerando na banda de valência uma lacuna positiva (h^+) (Fig 2). Assim que os fótons são absorvidos, são formados pares de e^-/h^+ (electrões/lacunas). A este processo chama-se a fotocatalise de um semicondutor, sempre com uma energia de Gibbs negativa: $\Delta G < 0$ (reação espontânea e termodinamicamente favorável).

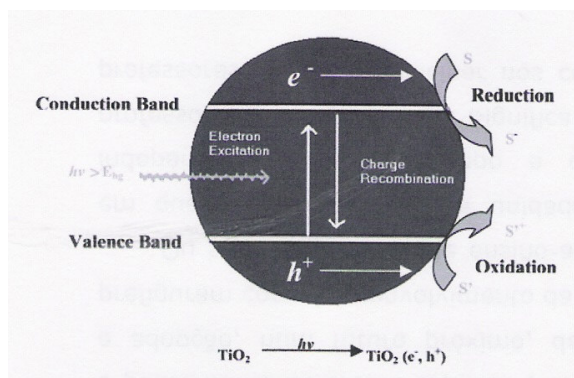
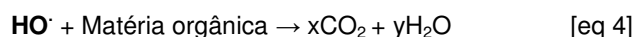
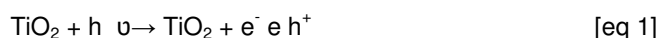


Fig. 2- Representação esquemática do processo fotocatalítico de um semiconductor (TiO_2); (esquema retirado de [24])

O destino destes pares e^-/h^+ é variável [25, 26]:

1. Poderão ficar presos em armadilhas superficiais ou em armadilhas internas no cristal
2. Poderão recombinar, não-radiativamente ou radiativamente, dissipando a energia excitada sob a forma de calor.
3. Poderão migrar para a superfície e reagir com aceitantes e doadores (oxigénio e a água) e formar radicais hidroxilo bastante reactivos, através de reacções redox com as moléculas do meio ambiente. As seguintes equações resumem os processos avançados de oxidação dos semicondutores, sendo a equação 4 responsável pela degradação e mineralização da matéria orgânica.



[eq 1]- **Fotocatálise do TiO_2** ; génese de pares e^-/h^+

[eq 2] – **Reacção de Redução** O electrão (e^-) reage com o oxigénio molecular presente na atmosfera e gera o anião superóxido, que por sua vez é uma espécie muito reactiva

[eq 3]- **Reacção de Oxidação**: A lacuna fotogerada (h^+) reage com a água para formar o radical hidroxilo.

[eq 4]- **Degradação da matéria orgânica**

1.3.2 - O dióxido de titânio (TiO_2) como fotocatalisador

Em 1972, Fujishima e Honda [27], descobriram a divisão fotoelectroquímica da molécula da água (H_2O) nos eléctrodos de TiO_2 , sob radiação UV: $(\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Pt} - \text{TiO}_2} \text{H}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2)$ [5][19][45]. Este acontecimento marcou o início da era da fotocatalise heterogénea do TiO_2 [26].

Devido ao seu elevado poder oxidante e redutor ($E^\circ=2,8 \text{ V}$; $E_{\text{gap}}= 3,2 \text{ eV}$), o TiO_2 é um dos fotocatalisadores mais eficientes usados em processos de limpeza ambiental (para a degradação de poluentes orgânicos e compostos aromáticos), na conversão e armazenamento de energia solar e também na área da medicina (inactivação de bactérias, vírus e células cancerígenas) [28,29].

Recentemente, as nanopartículas de TiO_2 ($< 100 \text{ nm}$) têm atraído a atenção dos investigadores das áreas da nanociência e da nanotecnologia. Quando o tamanho de partícula diminui, a razão área/volume aumenta drasticamente e consequentemente a área superficial relativa aumenta também. Para o caso em análise, esta característica é bastante vantajosa, já que a maior parte das reacções fotoquímicas ocorrem na superfície da estrutura cristalina do TiO_2 . Assim, as propriedades físicas promovidas pelas nanopartículas elevam a energia de hiato (E_{gap}) do TiO_2 , tornando-o mais fotoactivo e mais eficiente [25, 26,30]. De todas as formulações de nanopartículas de TiO_2 existentes, a formulação P-25 da *Degussa Corporation* é das mais utilizadas em experiências descritas na literatura [30].

O TiO_2 existe na natureza sob três formas cristalinas: anatase, rútilo e brookite, sendo o rútilo a forma mais frequente. Contudo, apesar de esta forma ser a mais abundante, a anatase é a forma que possui o potencial fotoactivo mais elevado de todas as fases cristalinas do TiO_2 [31, 32]. No entanto, a sua aplicação tecnológica é dificultada, devido à elevada energia de hiato ($E_{\text{gap}} 3,2 \text{ eV}$), que limita a fotoreactividade do TiO_2 à gama espectral UV ($\lambda \leq 390 \text{ nm}$).

Neste trabalho pretende-se estudar o processo fotocatalítico do TiO_2 sob a acção da luz solar, de forma a reproduzir as condições naturais a que os monumentos se encontram normalmente sujeitos. Assim, a energia necessária para a fotocatalise apenas utilizará a radiação UV-próxima ($< 380 \text{ nm}$), sendo de esperar que a

capacidade fotocatalítica do TiO_2 em degradar a matéria orgânica seja muito mais baixa que quando é apenas sujeita à acção de uma lâmpada UV, já que a proporção e intensidade da radiação UV no espectro electromagnético da radiação solar é pequena (5 – 10 %) em relação à radiação visível (45%) [26].

O ultrapassar da limitação da actividade fotocatalítica do TiO_2 à gama espectral UV tem sido resolvido através de vários métodos de dopagem que modificam a superfície do semiconductor: 1) dopagem do TiO_2 com metais de transição; 2) dopagem do TiO_2 com elementos não metálicos (por exemplo: N); 3) acoplamento de dois semicondutores (por exemplo: CdS e TiO_2); 4) sintetização da superfície.

De entre estes métodos, a dopagem das partículas de TiO_2 com catiões metálicos ($\text{TiO}_2\text{-M}^+$) tem sido dos métodos mais descritos e estudados. A adição de metais de transição à estrutura cristalina do TiO_2 permite estender a absorção para a região da luz visível modificando, assim, a sua eficácia fotocatalítica, (Fig. 3) [26, 33].

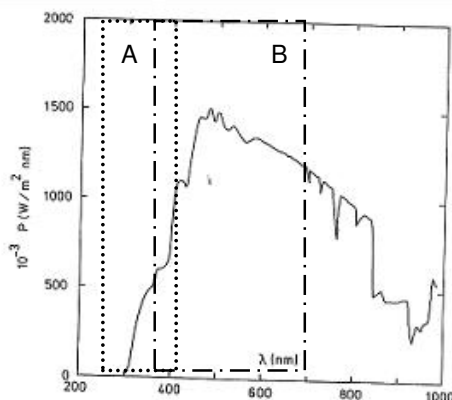


Fig. 3- Espectro de radiação solar; A) – Gama espectral UV utilizada para a fotocatalise do TiO_2 (\approx 5% da intensidade total do espectro electromagnético); B) Gama espectral utilizada para a fotocatalise do TiO_2 dopado com um elemento metálico (\approx 45% da intensidade total do espectro electromagnético) [34].

A reactividade fotocatalítica do $\text{TiO}_2\text{-M}^+$ depende de vários factores, incluindo o método de dopagem, a concentração do ião dopante, o tratamento térmico (calcinação da amostra) e a configuração electrónica do agente dopante na estrutura cristalina da anatase. Segundo Xiabo Chen (2005) [26], o aumento da actividade fotocatalítica, através de métodos de dopagem com metais de transição, encontra-se já provado para os seguintes elementos metálicos: Fe(III), Mo (V), Ru (III), Re(V), V (IV) e Rh (III) a 0,5%. Em particular, a dopagem do TiO_2 com Fe(III) (0,5 %) tem sido um dos principais tópicos de estudo de várias investigações [30, 35].

Apesar de o funcionamento do mecanismo de dopagem do TiO_2 com iões metálicos ainda não ter sido estudado aprofundadamente, vários autores referem que a utilização de catiões metálicos substituí intersticialmente as partículas de titânio, formando uma mistura dos dois óxidos [25, 36]. Contudo, a dopagem do TiO_2 com diferentes óxidos metálicos tem conduzido a resultados algo controversos, principalmente devido às diferentes formas de dopagem, que conduzem a diferentes propriedades morfológicas e cristalinas dos filmes dopados [36]. Certos estudos demonstraram também que o processo de dopagem pode induzir alguma instabilidade térmica nos materiais e que os iões metálicos poderão funcionar como armadilhas internas para os pares e^-/h^+ , diminuindo assim a actividade fotocatalítica [26].

Novas aplicações do TiO_2

Na última década, a aplicação das propriedades fotocatalíticas do TiO_2 estendeu-se também a materiais como vidros, polímeros e a peças têxteis de seda e lã [31, 37 - 39]. O facto de estes materiais poderem incorporar ou ser revestidos por este composto não tóxico, que não altera a cor nem a textura do material, é um benefício. Contudo, existem poucas referências na literatura científica relativas à aplicação das propriedades fotocatalíticas da anatase

para evitar a biodeterioração dos materiais de construção e consequentemente a sua aplicação em património cultural edificado [32][40].

De facto, a maior parte dos estudos relativos à aplicação de TiO_2 para atribuir propriedades de auto-limpeza aos materiais, concentram-se mais na degradação de poluentes (NO_x e SO_2) que propriamente na descontaminação microbiana, sendo pouco conhecido o mecanismo de funcionamento da inactivação biológica por parte do TiO_2 .

Pretende-se, assim, neste trabalho, descrever os procedimentos necessários para usufruir das potencialidades fotocatalíticas do TiO_2 eficientes na degradação da matéria orgânica para o controlo da biodeterioração em revestimentos do património cultural. Esta ideia, conceptualmente simples, pode vir a ser bastante promissora, uma vez que a suspensão ou imobilização do TiO_2 em materiais de construção, possibilitará constituir por si só um sistema de auto-limpeza, que funcionará ao nível da conservação preventiva, inibindo o crescimento de microrganismos. Para além da elevada actividade fotocatalítica, as propriedades super-hidrofílicas do TiO_2 , que facilitam a dispersão da água nas superfícies dos materiais, mantêm os materiais constantemente limpos, facilitando o processo de descontaminação microbiana.

Em alternativa à utilização dos biocidas convencionais, que apresentam sempre um certo grau de toxicidade, a ideia de utilizar o TiO_2 como fotocatalisador nos materiais de construção permite uma utilização eficiente de recursos naturais renováveis, como a energia solar, que constitui um método de controlo da biodeterioração perfeitamente compatível com a existência de um ambiente não poluído.

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos seleccionados

Para a aplicação dos tratamentos, seleccionaram-se dois biocidas, um biocida convencional, o **Biotin T®**, frequentemente utilizado em operações de limpeza do património cultural edificado, e um biocida usado em âmbito hospitalar como produto desinfectante de superfícies hospitalares: o **Anios DDSH®**. Por último, como produto alternativo aos biocidas, seleccionou-se o **TiO_2** (P-25 da Degussa Corporation), proporção anatase:rútilo = 4:1 e com uma área superficial específica de $50 \text{ m}^2/\text{g}$, correspondendo a um tamanho médio de partícula de cerca de 21 nm.

A Tabela 1 apresenta as principais características dos produtos químicos seleccionados. A especificação técnica dos produtos seleccionados encontra-se no Anexo I.

Tabela 1- Principais características dos produtos químicos seleccionados

Nome Comercial	Tipo de Produto	Princípio Activo	Modo de Actuação
Biotin T	Biocida orgânico de largo espectro	n-otil-isotiazol + sal de amónia quaternária + ácido fórmico	Biocida de superfície activa catiónica - afecta a membrana citoplasmática dos microrganismos
Anios D.D.S.H	Desinfectante orgânico de âmbito hospitalar	Sal de amónia quaternária + guanidino acetato+ n-propanol	Biocida de superfície activa catiónica - afecta a membrana citoplasmática dos microrganismos
TiO_2 (P25 Degussa)	Semicondutor Inorgânico	99,50 % TiO_2 80% de Anatase	Formação de radicais OH^\bullet reactivos, que degradam a matéria orgânica

2.2 Materiais de construção seleccionados

Para a avaliação do efeito anti-microbiano dos três produtos químicos referidos anteriormente, foram seleccionados dois tipos de argamassas com o mesmo traço volumétrico mas com agregados diferentes. Optou-

se por uma mistura de ligantes (argamassa bastarda) por ser o tipo de argamassa que foi aplicada no Palácio Nacional da Pena e por as argamassas de cal aérea com misturas com teores reduzidos de cimento serem referidas por certos autores como as mais adequadas para revestimentos de paredes [49].

Os materiais seleccionados e siglas adoptadas são apresentados de seguida:

1. **Argamassa bastarda de areia de Corroios (AC)**, semelhante à encontrada no reboco do Palácio Nacional da Pena, em Sintra
2. **Argamassa bastarda de areia de quartzo (AQz)**, a escolha deste tipo de argamassa deve-se ao facto de a sílica (SiO_2) ser considerada um suporte eficaz para a aplicação do TiO_2 , tendo-se optado também por uma argamassa de agregado predominantemente silicioso.



Fig. 4- Materiais de construção seleccionados. 1- Argamassa de areia de Corroios (AC); 2- Argamassa de areia de quartzo (AQz)

De modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados, foram utilizados três replicados do mesmo material para cada tipo de tratamento aplicado. As argamassas bastardas foram preparadas utilizando como ligantes a cal aérea hidratada em pó e o cimento branco Portland de calcário. Na argamassa de areia de Corroios, utilizou-se uma areia de pinhal de tonalidade amarelada, gomada (contém matéria orgânica e minerais argilosos) e não lavada. Na argamassa de areia de quartzo, o agregado é essencialmente composto por partículas de quartzo. Ambas as areias são comercializadas em saco, sujeitas a controlo das características.

A metodologia de preparação de ambas as argamassas bastardas foi semelhante. O procedimento efectuado baseou-se em indicações da Norma EN 1015-2: 1998. O procedimento de fabrico e composições das argamassas encontram-se no Anexo II.

As principais características mineralógicas e propriedades físicas dos componentes destes materiais bem como as descrições microscópicas dos agregados são resumidas no Anexo III.

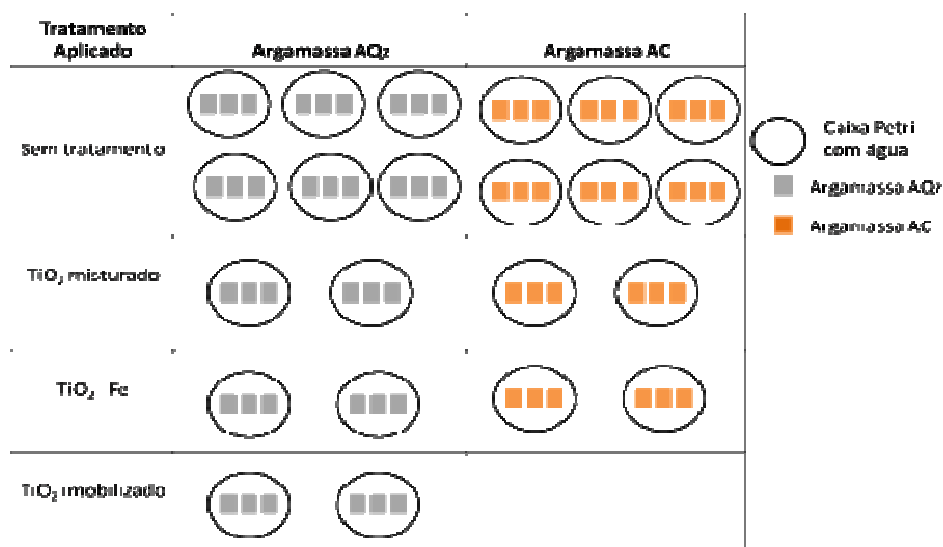
2.3 - Metodologia de aplicação dos tratamentos

A avaliação do efeito biocida dos três produtos seleccionados foi verificada de duas formas: através da realização de testes em laboratório, usando provetes de argamassas, e através de testes *in situ* aplicados em património cultural edificado (nas paredes exteriores do Palácio Nacional da Pena).

2.3.1- Testes em laboratório

Os testes em laboratório demonstraram ser bastante úteis, pois permitiram, por um lado, avaliar a possível nocividade que os tratamentos poderiam induzir nos substratos, e, por outro lado, possibilitaram a imobilização do TiO_2 nas argamassas, aplicando-o de forma preventiva. O esquema seguinte (Tabela 2) ilustra a metodologia de aplicação dos tratamentos:

Tabela 2- Esquema da metodologia de aplicação dos tratamentos nos diferentes tipos de provetes.



De modo a obter um registo comparativo da acção dos tratamentos, foram utilizados 18 triplicados, distribuídos em seis caixas Petri, sem nenhum tratamento aplicado, de cada tipo diferente de argamassa. Após o período de incubação, avaliou-se o crescimento biológico de três conjuntos de triplicados sem tratamento aplicado. Os restantes dois conjuntos de triplicados sem tratamento destinaram-se à aplicação dos dois produtos biocidas seleccionados: Anios D.D.S.H e Biotin T. Ambos os produtos foram aplicados em soluções aquosas. O Anios D.D.S.H foi aplicado por spray e o Biotin T por pincel. Os biocidas ficaram a actuar durante 2 semanas, sendo posteriormente avaliada a eficácia dos tratamentos. A aplicação do TiO₂ nos provetes das argamassas foi feita por duas metodologias diferentes. A primeira metodologia consistiu na mistura do TiO₂ juntamente com os restantes componentes das argamassas (TiO₂ misturado), de acordo com a seguinte proporção volumétrica:

12:4:4:1 – areia : cal aérea hidratada em pó: TiO₂: cimento

A segunda metodologia de aplicação do TiO₂ consistiu na imobilização do TiO₂ nas partículas de areia e foi apenas experimentada para a argamassa de areia de quartzo (TiO₂ imobilizado). Em todos os materiais foi ainda experimentado um método de dopagem do TiO₂ (TiO₂-Fe), contendo Fe⁺³ a 0,5 wt%. Esta metodologia foi efectuada através da impregnação aquosa do TiO₂ numa solução de nitrato de ferro nona-hidratado Fe(NO₃)₃·9H₂O (Sigma-Aldrich®), que continha já a quantidade de Fe⁺³ necessária para a dopagem (0,5 %) [43]. O produto obtido no processo de dopagem foi aplicado na AC, através da adição do TiO₂-Fe na mesma proporção volumétrica que a cal, e na AQz através da imobilização nas partículas da areia. A descrição dos procedimentos experimentais realizados bem como os cálculos necessários para a realização das experiências encontram-se no Anexo IV.

2.3.2- Testes *in situ* aplicados em património cultural

Para a realização dos testes aplicados em património cultural, seleccionaram-se duas zonas (paredes) do Palácio Nacional da Pena, em Sintra.

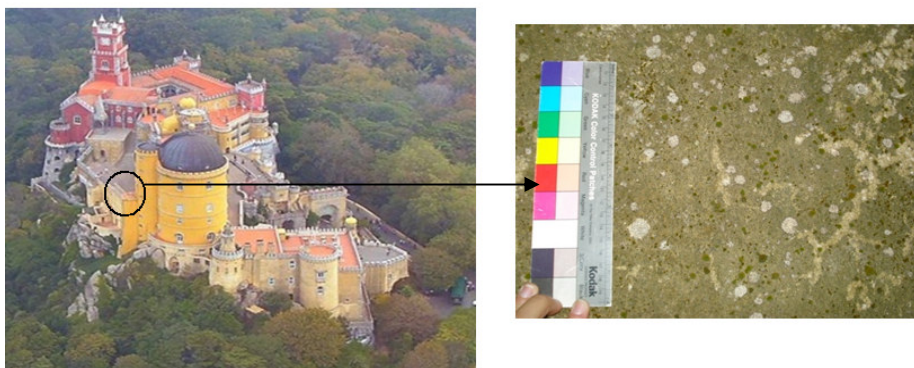


Fig 5 - Localização da 1ª zona seleccionada, no Pátio dos Arcos, no Palácio Nacional da Pena

A primeira zona seleccionada localiza-se no Pátio dos Arcos, encontrando-se numa parede orientada NW-SE, virada a SE. É caracterizada como um reboco de tonalidade castanho-amarelada. Uma vez que se encontra numa zona de sombra pouco exposta à radiação solar directa, é bastante húmida, sendo colonizada sobretudo por líquenes de pequenas dimensões e bactérias (Fig. 5).



Fig 6- Localização da 2ª zona seleccionada no Terraço D. Carlos, no Palácio Nacional da Pena

A segunda zona localiza-se a NE do Terraço D. Carlos. O reboco aqui encontrado é de tonalidade cor-de-rosa e, ao contrário do anterior, recebe radiação solar directa durante grande parte do dia (Fig 6). Em ambas as paredes, foram aplicadas suspensões aquosas dos três produtos em pequenas áreas (10x 15 cm). O Biotin T foi diluído a 2% e aplicado a pincel. O Anios DDSH foi aplicado directamente por spray, sem nenhuma diluição adicional. Por último, o TiO_2 foi aplicado a 1%, por spray.

Identificação da comunidade biológica presente nas paredes do Palácio da Pena

De modo a determinar a comunidade biológica presente nas paredes seleccionadas para a realização dos testes *in situ* foi realizada a identificação dos microrganismos por métodos de biologia molecular. As amostras biológicas foram recolhidas para dentro de um Eppendorf utilizando um bisturi esterilizado. As análises foram realizadas pela Drª Ana Miller, Drª Leonila Laiz e Drª Anna Romanowska-Deskins sob a orientação do Doutor Cesareo Saiz-Jimenez no Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas em Sevilha (Espanha).

2.4 - Caracterização do TiO_2 (P25-Degussa) puro e dopado com Fe^{+3}

A caracterização do pó de TiO_2 , puro e dopado foi realizada através de Espectroscopia de Raman, utilizando um microscópio Raman Horiba Jobin-Yvon Labram (presente no laboratório científico do departamento de conservação e restauro da FCT-UNL), com um laser vermelho de excitação He-Ne a 632,8 nm. As amostras foram

analisadas com uma objectiva de 100x. A potência incidente na amostra foi de 2,5 mW, com um feixe de 200 micrómetros.

Amostras do TiO₂ imobilizado nas partículas de quartzo da AQz e amostras de TiO₂ dopado com Fe⁺³ foram analisadas morfológica, qualitativamente e semi-quantitativamente utilizando um microscópio electrónico de varrimento JEOL Scanning Microscope T330A, equipado com um espectrómetro de raios-X de energia dispersiva (presente no laboratório do departamento de ciências da terra da FCT-UNL), (parâmetros de aquisição: 20 kV, 4000 nA)

De modo a caracterizar a fotossensibilidade derivada da dopagem do TiO₂ com o Fe⁺³, na gama espectral da luz visível, foram ainda realizadas análises de Espectroscopia UV-VIS de Reflectância difusa utilizando um espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-2501PC (presente no laboratório da fotoquímica da FCT-UNL), utilizando BaSO₄ como amostra padrão.

2.5 Material Biológico seleccionado

A eficácia da acção anti-microbiana dos três produtos foi avaliada através da inoculação artificial dos provetes com uma cultura mista de três microrganismos fotossintéticos: duas algas verdes (*Sticococcus bacillaris* e *Chlorella ellipsoidea*) e uma cianobactéria (*Gleocapsa dermochroa*), em meio de cultura líquido BG11. Estas espécies foram escolhidas por os géneros a que pertencem serem os principais colonizadores de materiais pétreos na Bacia Mediterrânica [5, 13].

2.5.1 - Inoculação dos provetes com microrganismos fotossintéticos

Antes da inoculação, os provetes foram esterilizados em autoclave (120°C, 1 atm, durante 10 minutos), de modo a garantir que não havia presença de organismos antes da inoculação. Após o arrefecimento, colocaram-se os provetes, em triplicado, em caixas de Petri (Ø15 cm) de vidro. Em seguida, adicionaram-se 10 ml de água esterilizada para manter uma humidade permanente no interior de cada caixa de Petri. Cada provete foi inoculado com 100 µl de cada uma das culturas fotossintéticas. O registo fotográfico dos provetes logo após a inoculação encontra-se no Anexo V. Pelas fotografias deste Anexo observa-se que no provete de argamassa de areia de quartzo as culturas inoculadas foram imediatamente absorvidas enquanto que na argamassa de areia de Corroios as culturas permaneceram à superfície do provete.

Incubação dos provetes

Após a inoculação, os provetes foram incubados no terraço do Departamento de Ciências da Terra da FCT-UNL durante um período de 4 meses (23/01/09 a 23/05/09), ficando sujeitos às condições ambientais aí existentes. De modo a garantir uma humidade permanente dentro das caixas de Petri, foi adicionada água esterilizada (~15 ml) pelo menos uma vez por semana.



Fig 7 – Incubação dos provetes em ambiente exterior

2.6 Avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados

Neste trabalho, a metodologia de avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados baseou-se na monitorização do crescimento fotossintético presente nos provetes, relacionando-o com a aplicação dos diferentes tratamentos. Nos testes laboratoriais, a eficiência dos tratamentos foi avaliada através da quantificação da emissão de fluorescência da clorofila *a*. Esta quantificação foi realizada por dois métodos diferentes: medição da fluorescência da clorofila *a*, *in vivo*, por espectrofluorimetria com fibra óptica e determinação da clorofila *a* pelo método de extracção, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Ambos os métodos se baseiam na capacidade de

emissão de fluorescência da molécula de clorofila *a*, permitindo avaliar a presença ou não de biomassa fotossintética nos provetes. A vantagem do método de espectrofluorimetria com fibra óptica é o facto de ser um método que não obriga à destruição das amostras como acontece com o método de extracção da clorofila *a*. A principal desvantagem da espectrofluorimetria com fibra óptica é que só permite determinar a quantidade de clorofila presente à superfície; isto é, no caso de ocorrer crescimento endolítico, este método subestima o valor da biomassa fotossintética enquanto que com o método de extracção este tipo de crescimento é quantificado [44].

2.6.1- Medições de fluorescência da molécula da clorofila *a*

Quantificação da clorofila através de espectrofluorimetria por fibra óptica

A fluorescência da clorofila *a* foi analisada sobre a superfície dos provetes, utilizando um espectrofluorímetro SPEX Fluorolog-3 Modelo FL3-22, com adaptador de fibra óptica F-3000, ligado a um computador para aquisição de dados (Fig 8). Todas as amostras foram excitadas a 430 nm, 0,300 s de tempo de integração, com slits a 4,5 nm na emissão e excitação. De modo a avaliar possíveis variações de intensidade de radiação do espectrofluorímetro, o registo espectrofluorimétrico da Rodamina foi também recolhido sempre que se utilizava o aparelho. Este padrão permite corrigir quaisquer alterações de intensidade da lâmpada (Anexo VI). Em todos os provetes, foram efectuadas medições de fluorescência antes da inoculação, logo após a inoculação e após 4 meses de incubação. Foram efectuadas três medições, em cada provete, percorrendo longitudinalmente a área superficial do provete. O cabo de fibra óptica foi colocado perpendicularmente à superfície do provete (Fig 8). Entre a extremidade do cabo e a superfície do provete colocou-se um “O-ring” de modo a garantir sempre a mesma distância de irradiação.



Fig. 8 – Medição de fluorescência por espectrofluorimetria com fibra óptica

Para a monitorização do crescimento biológico presente nos provetes, todas as medições de fluorescência foram realizadas excitando-se as amostras a 430 nm, comprimento de onda ideal para a emissão de fluorescência da molécula de clorofila *a*, sendo a sua presença confirmada pela presença de um pico de emissão típico a 680 nm.

Determinação da clorofila através de método de extracção com DMSO

A clorofila *a* é um pigmento presente em todos os organismos fotossintéticos, sejam eles eucariotas (algas verdes) ou procariotas (cianobactérias), que se encontra nas membranas dos tilacóides. O método de extracção da clorofila é utilizado para a quantificação da clorofila, usada como medida de biomassa de organismos fotossintéticos. Com o objectivo de monitorizar e quantificar o crescimento fotossintético no volume total de cada provete, determinou-se a concentração de clorofila *a* inicial (logo após a inoculação) e clorofila *a* presente nos provetes após 4 meses de incubação. A clorofila *a* foi extraída utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente e sua concentração determinada por espectrofluorimetria. Para tal, utilizou-se o espectrofluorímetro SPEX Fluorolog-3 Modelo FL3-22. O procedimento seguido é o descrito por Vollenweider (1974) [45]. A descrição deste procedimento encontra-se no Anexo VII, sendo o protocolo para a obtenção da recta de calibração do espectrofluorímetro encontrado no Anexo VIII.

2.6.2 – Caracterização Colorimétrica

A colorimetria é uma técnica de caracterização bastante útil na medida em que permite uma leitura rigorosa e quantitativa dos parâmetros colorimétricos que definem a cor do substrato. A determinação dos parâmetros colorimétricos antes e após a aplicação de um tratamento permitiu avaliar a eficácia do tratamento. Os tratamentos

terão sido eficazes se os parâmetros colorimétricos analisados após o tratamento se aproximarem o mais possível aos exibidos para as colorações originais das superfícies.

Para a caracterização colorimétrica, foi utilizado um espectrofotómetro portátil Minolta Spectrophotometer CM-508i. O modelo colorimétrico usado neste trabalho foi o modelo CIELAB que é constituído por três parâmetros, a luminosidade L^* e duas coordenadas cromáticas, a^* (componente vermelho - verde) e b^* (componente amarelo – azul). Utilizou-se o iluminante D65, que reproduz artificialmente a luz de dia, com um ângulo de observação de 10° . Foram realizadas três medições colorimétricas antes e após a aplicação dos tratamentos, *in situ*, no Palácio Nacional da Pena.

3.Resultados e Discussão

3.1- Identificação da comunidade biológica presente nas paredes do Palácio da Pena

A identificação da comunidade biológica, presente nas paredes do Palácio da Pena, por métodos de biologia molecular encontra-se no Anexo IX. Após a consulta destes dados verifica-se que os métodos de biologia molecular permitiram identificar a alga verde *Trentepohlia* sp no Pátio dos Arcos. Esta identificação está de acordo com o observado macroscopicamente no Pátio dos Arcos, pois a alga *Trentepohlia* sp ocorre frequentemente associada a líquenes, organismos bastante abundantes nesta parede. No Terraço D. Carlos apenas se identificou a presença de Chlorophytas, não sendo possível determinar qual o género. Relativamente às cianobactérias identificadas, observou-se uma maior biodiversidade destes microrganismos no Terraço D. Carlos do que no Pátio dos Arcos. No Terraço D. Carlos foi possível identificar a cianobactéria *Nostoc punctiforme* que tem a capacidade de fixar azoto directamente do ar.

Na identificação de fungos e bactérias verifica-se uma maior biodiversidade destes microrganismos nas paredes do Pátio dos Arcos do que no Terraço D. Carlos. No Terraço D. Carlos identificaram-se apenas fungos do género *Caloplaca* e *Xanthoria* e a bactéria *Hymenobacter*.

Por fim, pode-se concluir que a comunidade biológica é mais diversificada e abundante nas paredes do Pátio dos Arcos do que no Terraço D. Carlos. Isto acontece porque o microclima das paredes do Pátio dos Arcos apresenta condições mais favoráveis para o desenvolvimento biológico, uma vez que esta zona se encontrara à sombra, sem radiação solar directa, o que facilita a retenção de água e humidade, factor limitante e fundamental para o desenvolvimento microbiano. No Terraço D. Carlos foi possível identificar apenas uma maior biodiversidade de cianobactérias, microrganismos mais resistentes a ambientes mais inóspitos.

3.2 – Caracterização do TiO₂ (P25 – Degussa) puro e dopado com Fe⁺³

3.2.1 – Espectroscopia de Raman

As nanopartículas de TiO₂ (P25 da Degussa) foram analisadas e aplicadas sem qualquer modificação superficial ou pré-tratamento. Este composto é caracterizado como um pó branco de elevada pureza cristalina ($\approx 99,5\%$). De modo a garantir que a aplicação dos tratamentos com TiO₂ estava a ser realizada com a fase cristalina de maior acção fotocatalítica, ou seja, com a anatase, efectuaram-se análises por Espectroscopia de Raman ao pó de TiO₂ (P25- Degussa) puro, e dopado com Fe⁺³.

A Fig 9 apresenta o espectro de Raman recolhido para as amostras de TiO₂ (P25-Degussa) dopado e não dopado. Os três picos presentes na região dos 400-650 cm⁻¹ são característicos para as estruturas cristalinas O-Ti-O, quer da anatase, quer do rútilo. Contudo, para a anatase existem tipicamente cinco picos activos por análise de Raman: 144 cm⁻¹; 197 cm⁻¹; 397 cm⁻¹; 518 cm⁻¹; 640 cm⁻¹, derivados da estrutura tetragonal ($3E_g + 2B_{1-g} + 1A_{2g}$). Todos estes cinco picos são visíveis na Fig 9, confirmando a presença da anatase, quer nas amostras dopadas com Fe⁺³, quer nas amostras não dopadas. Nas amostras de TiO₂ dopadas com Fe⁺³ não são encontrados

nenhuns picos (para além da anatase) relacionados com compostos de ferro. Tal pode dever-se à pequena quantidade adicionada do agente dopante, conduzindo à elevada dispersão deste na amostra ou à eficaz substituição intersticial do Fe^{+3} na estrutura cristalina do TiO_2 , comprovando que o método de dopagem foi bem conseguido.

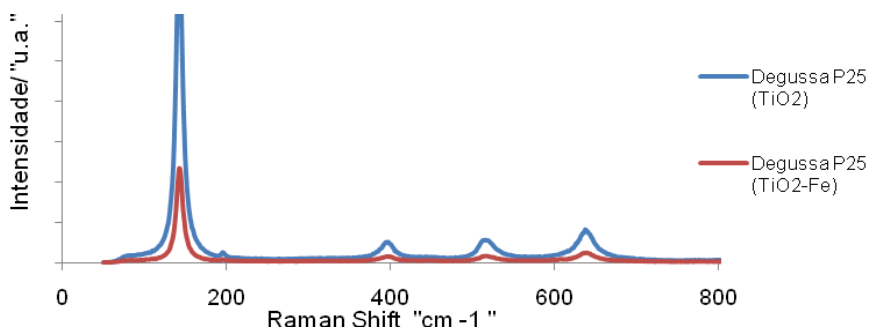


Fig. 9- Espectro de Raman do TiO_2 P25 da Degussa dopado e não dopado, correspondendo à anatase

3.2.2 – Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A Sílica (SiO_2) é um substrato inorgânico eficiente para a imobilização da anatase. Este facto deve-se às maiores áreas superficiais a à grande capacidade de absorção do TiO_2 por parte da sílica (SiO_2) [18]. A Fig 10 apresenta a microestrutura obtida por SEM de uma partícula de quartzo da areia da AQz com TiO_2 imobilizado, onde se observa a presença de um fino e homogéneo filme de TiO_2 na superfície do grão de areia. A análise elementar por EDX, por seu lado confirma a presença de Ti.

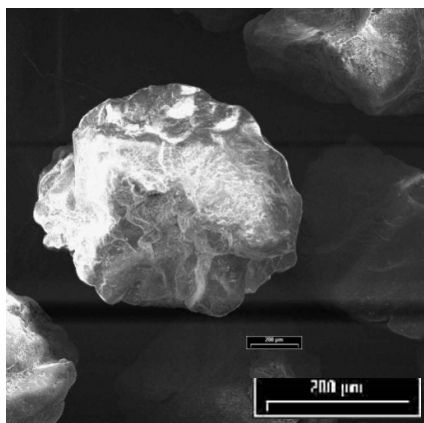


Fig. 10 – Imagem obtida por SEM das partículas de quartzo com TiO_2

A caracterização micro-estrutural do processo de dopagem do TiO_2 com Fe^{+3} (0,5 wt%) foi também realizada através de SEM, Na Fig. 11 é possível observar-se a presença de agregados, correspondentes à presença de óxidos mistos de Fe-TiO_2 .

A análise por EDX permitiu determinar e quantificar a composição elementar da amostra de TiO_2 dopada (Tabela 4), confirmando que o processo de dopagem foi bem sucedido.

Tabela 3 - Composição Elementar obtida por EDX

Elemento	Wt%
Ti	2.73
Al	9.03
Fe	6.57
Si	81.67

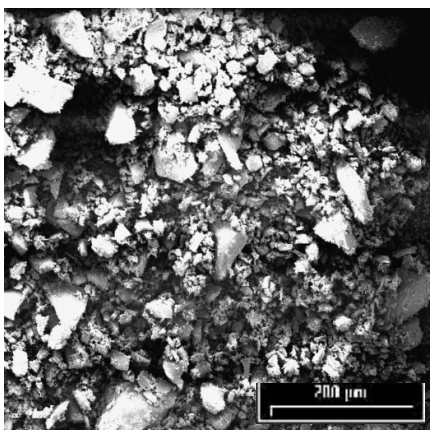


Tabela 4 - Composição Elemental obtida por EDX		
Elemento		Wt%
Ti		76.37
Fe		23.63

Fig 11 – Imagem obtida por SEM de uma amostra de TiO₂ dopado com Fe.

3.2.3 – Caracterização das propriedades ópticas dos filmes de TiO₂, puros e dopados com Fe.

Após o processo de dopagem do TiO₂ com a solução de nitrato de ferro, a cor do pó muda de branco para amarelo claro. A alteração de cor é verificada no espectro B da Fig 12, já que a absorção do filme TiO₂-Fe se estende mais para a zona dos VIS, quando comparado com o filme de TiO₂ não dopado. A mudança espectral da absorção do filme de TiO₂-Fe estreita a “band gap” da estrutura electrónica do TiO₂, o que faz aumentar a sua actividade fotocatalítica para a gama espectral da luz visível (400-700 nm).

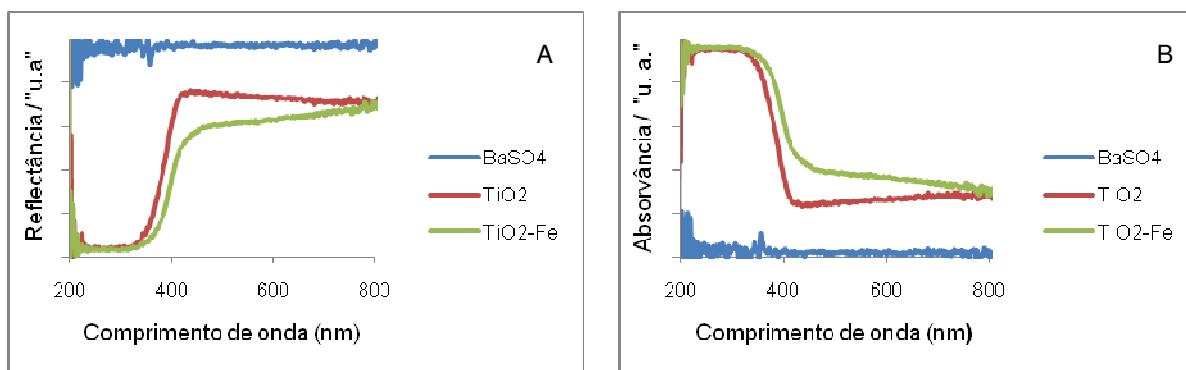


Fig. 12 – Espectroscopia UV-VIS dos filmes de TiO₂ (P25-Degussa) puro e dopado (Fe⁺³). A) Medições de Reflectância difusa; B) Medições de Absorção

A mudança de absorção dos filmes de TiO₂-Fe para a zona do visível, adoptando uma coloração amarelada, deve-se, por um lado, às transições d-d do catião trivalente do Fe (${}^2T_{2g} \rightarrow {}^2A_{2g}, {}^2T_{1g}$) ou, por outro lado, a processos de transferências de carga entre os catiões de Fe ($Fe^{+3} + Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+4} + Fe^{+2}$) [46].

Segundo Asilturk et al [47], a banda gap (E_{gap}) do “novo composto” TiO₂-Fe pode ser estimada graficamente ($\alpha h\nu^2$ vs $h\nu$, sendo α o coeficiente de absorção), sendo que, para concentrações molares de 0,5%, (como as utilizadas neste processo de dopagem) a “nova” band gap, terá valores entre: 2,97 eV > E_{gap} > 2,88 eV.

3.3 – Avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados em laboratório

A avaliação da eficácia dos três tipos de tratamentos aplicados em laboratório foi realizada através de técnicas de quantificação da clorofila a (por espectrofluorimetria com fibra óptica e pelo método de extracção)

3.3.1 – Quantificação da clorofila a, in vivo, determinada por espectrofluorimetria com fibra óptica

Fluorescência inicial das amostras, antes da inoculação

De modo a garantir que não havia presença de clorofila antes da inoculação dos provetes, analisou-se a fluorescência inicial da superfície das argamassas, através do uso da fibra óptica.

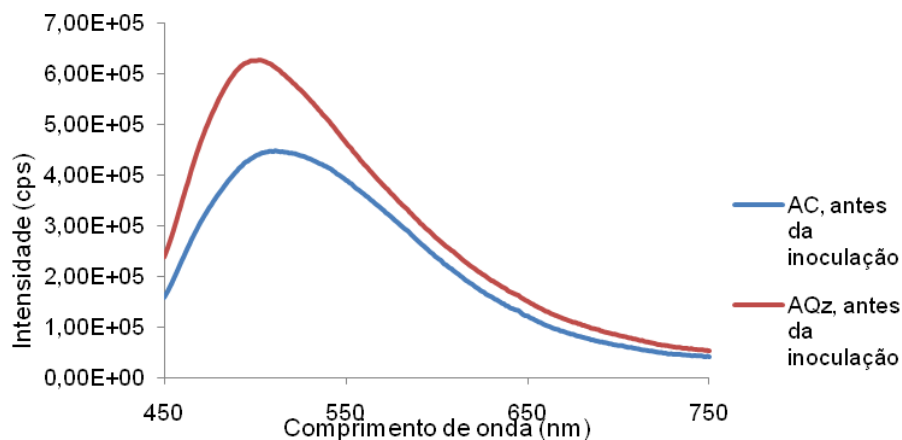


Fig. 13 - Espectro de emissão de fluorescência média dos provetes, antes da inoculação

A Fig 13 apresenta a fluorescência média dos diferentes materiais de construção antes da inoculação. Como se pode verificar, não existe qualquer pico de emissão de fluorescência na gama espectral entre os 650-700 nm, (gama espectral de emissão da molécula de clorofila), indicando a ausência de microrganismos fotossintéticos.

Fluorescência das amostras após a inoculação

Após a inoculação, mediu-se novamente a fluorescência dos provetes de modo a verificar a presença de clorofila *a*.

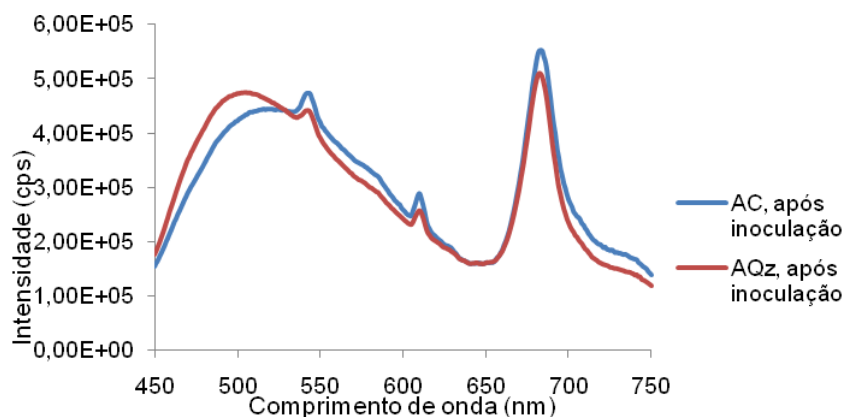


Fig. 14 - Espectro de Fluorescência após a inoculação dos provetes.

A Fig 14 apresenta os espectros de emissão de fluorescência dos materiais, logo após a inoculação. Verifica-se, em ambas as argamassas, a presença de um pico de emissão entre os 650-700 nm, que corresponde à presença da molécula de clorofila *a*. A presença deste pico prova que a inoculação foi bem sucedida. A Tabela 5, contém a gama de valores de intensidade a 683 nm dos diferentes materiais, antes e após a inoculação.

Tabela 5 - Gama de intensidades médias de fluorescências dos materiais, a 683 nm

Material	Gama de intensidade média, antes da inoculação (683 nm)	Gama de intensidade média, após a inoculação (683 nm)
Argamassa de areia de Corroios (AC)	$7,2 \times 10^4 - 1,1 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5 - 5,5 \times 10^5$
Argamassa de areia de Quartzito (AQz)	$9,5 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5 - 4,2 \times 10^5$

Após a observação da Tabela 5, verifica-se que a AQz apresenta valores de emissão de fluorescência, após inoculação, menores que a AC. Este facto deve-se provavelmente à diferença de porosidades das duas argamassas. A observação dos registos fotográficos efectuados logo após a inoculação permitiu verificar as diferenças nas propriedades hídras dos materiais (Anexo V). Quando foi efectuada a inoculação na AQz, as culturas líquidas foram absorvidas para o interior do provete (Anexo V, Fig 1). Na AC, observa-se a mistura das culturas sobre a superfície do provete, sendo apenas parcialmente absorvida pelo material (Anexo V, Fig 2), confirmando uma menor porosidade desta argamassa.

A diferença de porosidade entre as argamassas pode dever-se sobretudo à diferente forma e dimensão dos agregados, já que a proporção volumétrica e os ligantes usados são iguais em ambas as argamassas. Segundo [51], a utilização de agregados de forma arredondada (semelhante à forma do agregado de AQz) (Anexo III) pode levar à formação de poros de grandes dimensões, contrariamente à utilização de agregados de forma angulosa, semelhantes aos de AC (Anexo III). Também a utilização de agregados mais finos (semelhantes aos de AQz) influenciam uma maior porosidade das argamassas, pois conseguem comportar uma maior quantidade de água, que, por sua vez, faz aumentar a retracção durante o processo de secagem, conduzindo a uma maior formação de fissuras.

Observação macroscópica do desenvolvimento biológico presente nos provetes

Logo após o primeiro mês de incubação, começou a verificar-se a presença de uma fina e heterogénea camada de biofilme verde na superfície dos provetes sem tratamento aplicado. Nos provetes de AQz verificou-se igualmente, após o primeiro mês, uma colonização biológica mais desenvolvida do que nos provetes de AC. O registo fotográfico dos provetes durante o período de incubação é apresentado no Anexo X.

Fluorescência das amostras após o período de incubação

Após 4 meses de incubação, realizaram-se novamente medições de fluorescência nos provetes. Os gráficos seguintes dizem respeito às medições médias de fluorescência por espectrofluorimetria com fibra óptica, obtidas após o período de incubação para as amostras sem tratamento, para as amostras com TiO_2 e para as amostras após a aplicação dos biocidas Biotin T e Anios D.D.S.H. Note-se que a fluorescência média obtida após a inoculação também se encontra traçada nos gráficos de modo a verificar a morte ou o crescimento dos microrganismos e, conseqüentemente, a eficácia dos tratamentos. Uma tabela com as gamas de intensidades de fluorescência, obtidas a 683 nm, durante o período de incubação encontra-se no Anexo XI.

Os gráficos de emissão de fluorescência, determinado por espectrofluorimetria com fibra óptica, durante o período de incubação para os diferentes tratamentos encontram-se no Anexo XII.

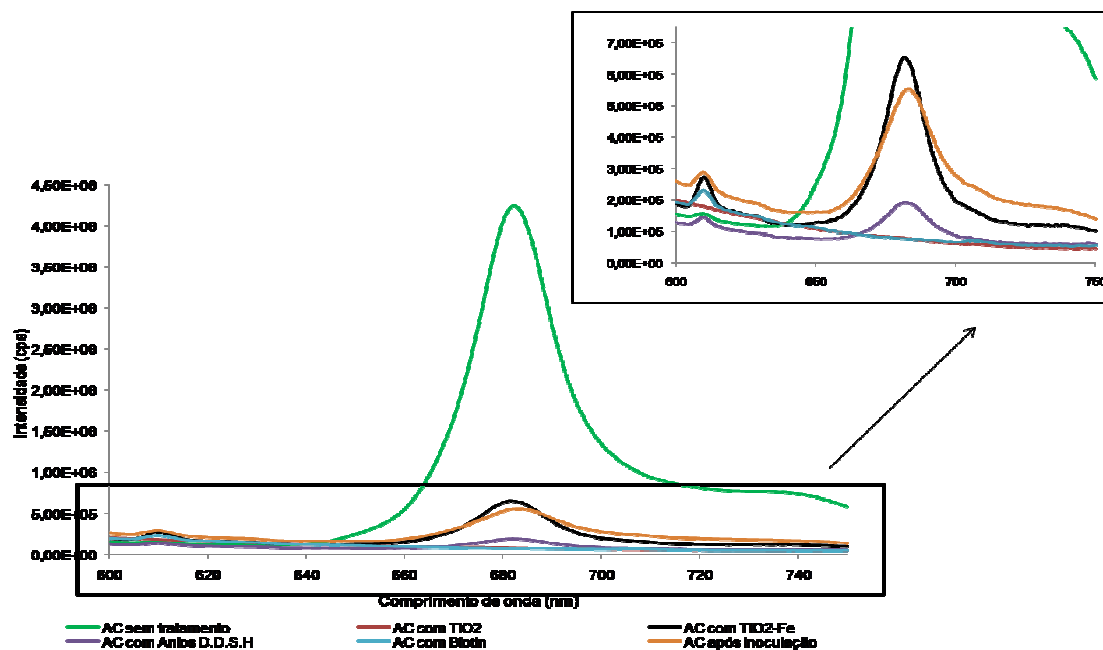


Fig. 15 – Espectro de emissão de fluorescência (médio) para os provetes de AC, após o período de incubação

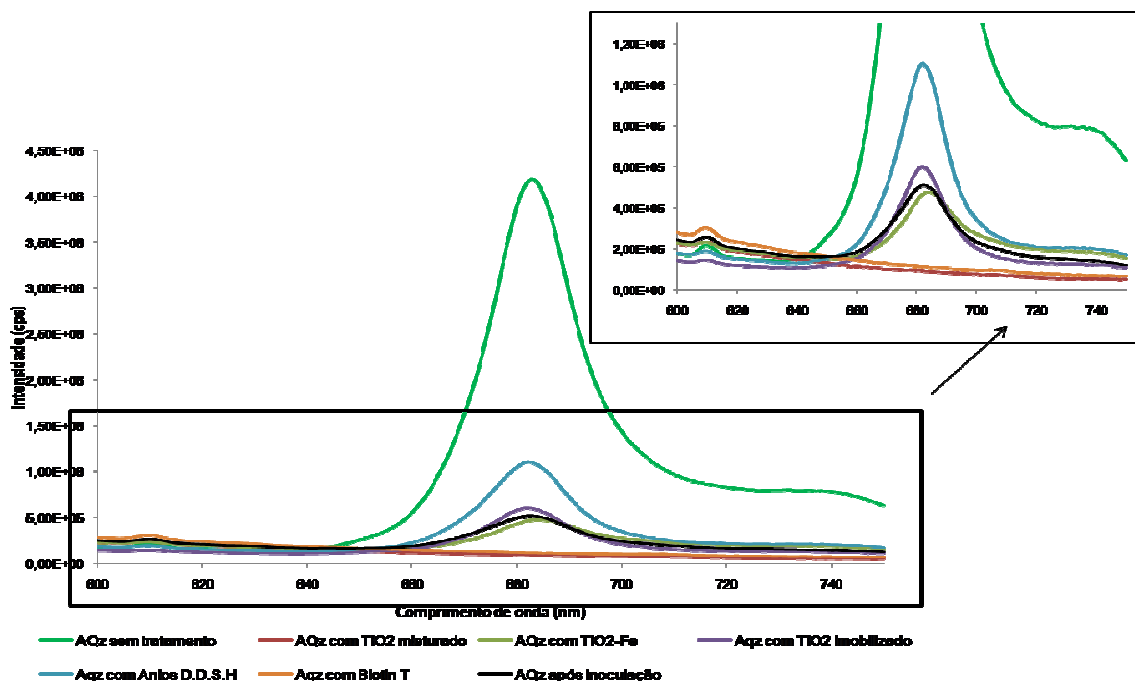


Fig. 16 – Espectro de emissão de fluorescência para os provetes de AQz, após o período de incubação

3.3.2- Quantificação da clorofila *a*, determinada pelo método de extracção

A clorofila foi extraída utilizando DMSO como solvente. Após o processo de filtragem e centrifugação, a quantificação foi feita por espectrofluorimetria. Através da calibração do espectrofluorímetro, efectuada anteriormente (Anexo VIII), foi possível quantificar (μl) a quantidade de clorofila *a* inicial (após inoculação) e a clorofila *a* presente nos provetes após 4 meses de incubação (Anexo XIII). As figuras 17 e 18 apresentam a quantidade de clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) presente nos provetes de AC e AQz, após inoculação e após 4 meses de incubação.

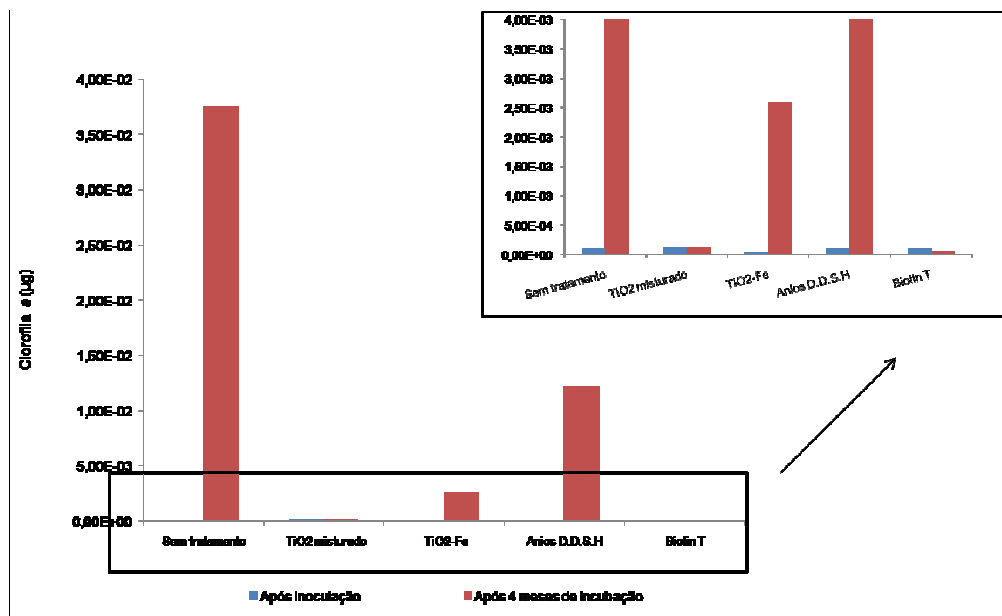


Fig 17 – Quantidade de clorofila a (µg) presente nos provetes de AC, logo após inoculação e após 4 meses de incubação

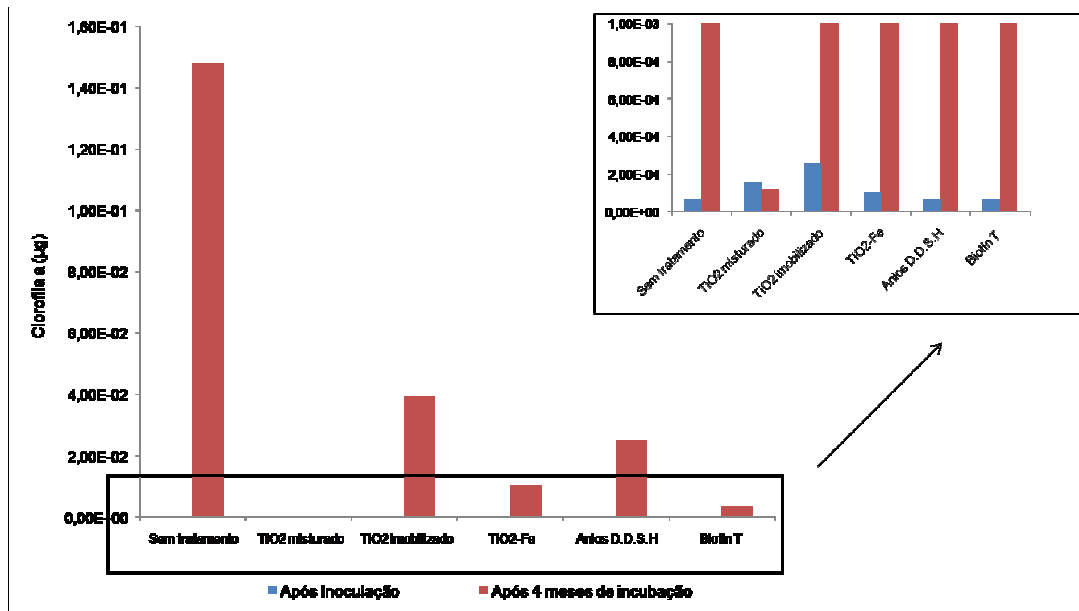


Fig 18 – Quantidade de clorofila a (µg) presente nos provetes de AQz, após inoculação e após 4 meses de incubação

Discussão e avaliação dos tratamentos em laboratório

As técnicas de quantificação da clorofila *a* permitiram avaliar a eficácia dos tratamentos aplicados, sendo que, tanto a espectrofluorimetria com fibra óptica como o método de extracção apresentaram a mesma coerência nos resultados (Tabela 6). Contudo, os resultados obtidos no método de extracção, são mais rigorosos, já que esta técnica permite determinar o crescimento biológico que se desenvolveu no interior dos provetes, permitindo uma quantificação da clorofila *a* em todo o volume da amostra. Ao analisar as Figuras 17 e 18 verifica-se, após 4 meses de incubação, que os provetes de AC apresentam uma quantidade de clorofila *a* significativamente menor (0,04 µg) do que os provetes de AQz (0,15 µg), facto que não se apresenta tão explícito nas análises por espectrofluorimetria por fibra óptica (Fig 15 e 16). Assim salienta-se a importância do método de extracção para a quantificação mais rigorosa da clorofila em toda a amostra, possibilitando verificar a existência de crescimento endolítico nos provetes de AQz.

Tabela 6 – Valores de fluorescência e quantificação da clorofila *a* para as duas argamassas, após inoculação e após 4 meses de incubação

		Espectrofluorimetria por fibra óptica	Método de Extração ($\mu\text{g Chla/ cm}^3$)
Sem tratamento	Após Inoculação	$5,6 \times 10^5$	$8,9 \times 10^{-5}$
	Após 4 meses	$5,5 \times 10^6$	$3,7 \times 10^{-2}$
TiO_2 misturado	Após Inoculação	$5,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-4}$
	Após 4 meses	$7,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^{-4}$
TiO_2 -Fe	Após Inoculação	$5,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-5}$
	Após 4 meses	$6,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-3}$
Anios	Após Inoculação	$5,6 \times 10^5$	$8,9 \times 10^{-5}$
	Após 2 semanas	$1,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-2}$
Biotin	Após Inoculação	$5,6 \times 10^5$	$8,9 \times 10^{-5}$
	Após 2 semanas	$7,5 \times 10^4$	$6,2 \times 10^{-5}$
		Espectrofluorimetria por fibra óptica	Método de Extração ($\mu\text{g Chla / cm}^3$)
Sem tratamento	Após Inoculação	$2,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{-5}$
	Após 4 meses	$5,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-1}$
TiO_2 misturado	Após Inoculação	$8,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-4}$
	Após 4 meses	$9,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^{-4}$
TiO_2 imobilizado	Após Inoculação	$3,7 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-4}$
	Após 4 meses	$6,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^{-2}$
TiO_2 -Fe	Após Inoculação	$5,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-4}$
	Após 4 meses	$4,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-2}$
Anios	Após Inoculação	$2,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{-5}$
	Após 2 semanas	$1,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^{-2}$
Biotin	Após Inoculação	$2,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{-5}$
	Após 2 semanas	$1,1 \times 10^5$	$3,4 \times 10^{-3}$

Em ambas as argamassas sem tratamento verifica-se, após quatro meses de incubação, um crescimento biológico significativo, com valores de intensidade de fluorescência com uma ordem de grandeza acima dos valores de fluorescência obtidos logo após inoculação e valores de quantidade de clorofila *a* ($\mu\text{g/ cm}^3$) com três a quatro ordens de grandeza acima da quantidade determinada após inoculação.

Relativamente à eficácia dos tratamentos, através da observação das Fig.17 e 18 conclui-se que todos os tratamentos foram eficazes, já que todos os provetes tratados apresentavam um quantidade de clorofila *a* significativamente menor, que os provetes sem tratamento aplicado (Tabela 6). Contudo, os melhores resultados foram obtidos nos provetes tratados com TiO_2 misturado e com o biocida Biotin T.

Verifica-se assim que no tratamento com TiO_2 , a metodologia de aplicação mais eficaz é a aplicação do TiO_2 através da mistura com os restantes componentes das argamassas ($\text{TiO}_{\text{misturado}}$), tendo-se verificado resultados bastantes satisfatórios, quer para os provetes de AC, quer para os provetes de AQz. Os valores de intensidade de fluorescência obtidos por espectrofluorimetria de fibra óptica nos provetes com $\text{TiO}_{2\text{misturado}}$ são semelhantes aos exibidos pelos provetes antes da inoculação, provando que superficialmente os processos redox estabelecidos por este fotocatalisador com as moléculas do meio ambiente foram eficazes na geração de radicais hidroxilo reactivos

responsáveis pela degradação da matéria orgânica, pois verifica-se a morte das culturas inoculadas (Fig 2 e 8 do Anexo XII).

Analisando os resultados obtidos pelo método de extracção, após o período de incubação, verifica-se uma diferença significativa na quantidade de clorofila presente nos provetes com $\text{TiO}_{2\text{misturado}}$ e nos provetes sem tratamento (Tabela 6). Também se verifica que a quantidade de clorofila presente nos provetes com $\text{TiO}_{2\text{misturado}}$ após o período de incubação é menor que a determinada logo após inoculação, provando a eficácia deste fotocatalisador na degradação e mineralização da matéria orgânica (Tabela 6)

O método de dopagem do TiO_2 com o Fe^{+3} foi bem conseguido, contudo os resultados obtidos após o período de incubação são menos satisfatórios, quando comparados com o $\text{TiO}_{2\text{misturado}}$. No processo da dopagem metálica do TiO_2 é fundamental manter a integridade electrónica na estrutura cristalina do semiconductor, ou seja, é fundamental que as alterações electrónicas produzidas pela adição do Fe^{+3} na estrutura cristalina do TiO_2 sejam favoráveis, garantindo uma razão espacial correcta entre catiões e aniões. A substituição intersticial entre os catiões, é facilitada devido à semelhança dos raios iónicos Ti^{4+} (0,75 Å) e Fe^{+3} (0,79 Å). Contudo, através da análise das Fig 17 e 18 verifica-se que o $\text{TiO}_2\text{-Fe}$ não foi totalmente eficaz na degradação da matéria orgânica, pois durante o período de incubação houve crescimento biológico nestes provetes (Tabela 6). Tal poderá dever-se a uma adição excessiva de Fe na matriz cristalina da anatase, conduzindo à formação de agregados de hematite (Fe_2O_3) e/ou óxidos de ferro e titânio mistos (Fe_2TiO_5) apenas na superfície do TiO_2 , diminuindo assim a sua acção fotocatalítica [47]. Para além disso, vários autores referem a possibilidade de o catião metálico poder funcionar como um centro de recombinação dos pares e^-/h^+ , não possibilitando a separação de cargas, e, consequentemente o processo de degradação da matéria orgânica.

Apesar de a aplicação do $\text{TiO}_2\text{-Fe}$ não ter sido muito eficaz na degradação da matéria orgânica, pode afirmar-se que este composto foi eficaz na prevenção de um crescimento biológico mais desenvolvido, já que a quantificação da clorofila nestes provetes apresenta unidades de grandeza, de uma ordem abaixo, aos exibidos pelos provetes sem qualquer tratamento aplicado (Tabela 6).

A metodologia de aplicação do TiO_2 através da imobilização nas partículas de areia de quartzo ($\text{TiO}_{2\text{imobilizado}}$) apresenta os resultados menos satisfatórios. Na Fig 18 é possível verificar que os provetes de AQz com este tratamento apresentam maiores quantidades de clorofila do que para qualquer outro tratamento aplicado. Tal pode dever-se à pouca eficácia do processo de imobilização, já que, por análise elementar EDX, se verifica uma quantidade muito pequena de Ti na superfície dos grãos de quartzo da areia (Tabela 3). A quantidade esperada era muito maior, dado que o método de imobilização compreendia a imobilização do TiO_2 na superfície específica total da partícula de areia. Contudo, nos casos em que foi feita a aplicação do TiO_2 por esta metodologia, as amostras apresentam valores de clorofila a menores do que nos provetes sem qualquer tratamento aplicado, comprovando, apesar de tudo, alguma eficácia do tratamento.

Relativamente à aplicação dos produtos biocidas, verifica-se para ambas as argamassas, uma maior eficácia na eliminação dos microrganismos para o tratamento com Biotin T. A aplicação do produto Anios D.D.S.H apresenta resultados muito pouco satisfatórios em ambas as técnicas de quantificação de clorofila a, sendo desaconselhável a sua aplicação como biocida em património cultural.

Por último, para uma fácil e simples compreensão da eficácia dos tratamentos testados apresenta-se de seguida um índice de eficácia de tratamento (por ordem decrescente de eficácia).

$$\text{TiO}_{2\text{misturado}} > \text{Biotin T} > \text{TiO}_2\text{-Fe} > \text{Anios D.D.S.H} > \text{TiO}_{2\text{imobilizado}}$$

O índice apresentado é referente aos valores obtidos para o método de extracção.

3.4– Avaliação da eficácia dos tratamentos aplicados *in situ* em património cultural

3.4.1 – Caracterização colorimétrica

A caracterização colorimétrica antes e após a aplicação dos três tratamentos permitiu avaliar a eficácia da aplicação directa dos produtos, em solução, sobre as superfícies do Palácio Nacional da Pena.

De modo a obter um registo comparativo e avaliar a eficácia dos tratamentos, as cores originais das paredes onde se realizaram os testes foram também caracterizadas, através de medições colorimétricas na mesma parede, mas em zonas que não se encontravam colonizadas biologicamente, representadas nos gráficos seguintes como *Referência 1* e *2*, respectivamente no Pátio dos Arcos e no Terraço D. Carlos

Os dois primeiros gráficos (Fig 19 e 20) apresentam os parâmetros colorimétricos L* a* b* recolhidos para todos os três tratamentos, no Pátio dos Arcos e no Terraço D. Carlos, respectivamente, após 2 semanas de aplicação dos tratamentos. A análise da eficácia dos tratamentos foi feita através da comparação entre os parâmetros L*a*b* exibidos para cada tratamento e com a respectiva coloração original própria da zona seleccionada, apresentada no gráfico como *Referência 1* e *2*. O último gráfico (Fig 21) diz respeito aos parâmetros colorimétricos obtidos para o tratamento com TiO₂ (por este ter sido mais eficaz), antes da aplicação e após 2 semanas de aplicação e a respectiva comparação com a coloração original da zona seleccionada, *Referência 2*. Os valores de L*a*b*, obtidos nas três medições, para as duas paredes seleccionadas encontram-se presentes na Tabela 1 e 2 do Anexo XIV.

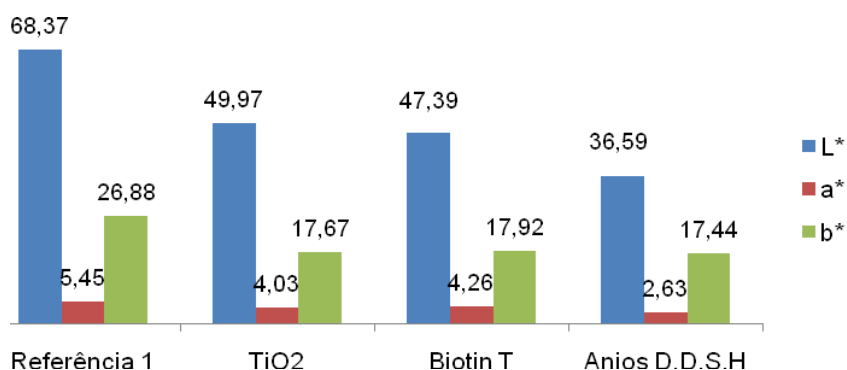


Fig. 19 – Parâmetros colorimétricos obtidos após 2 semanas de aplicação dos tratamentos, no Pátio dos Arcos

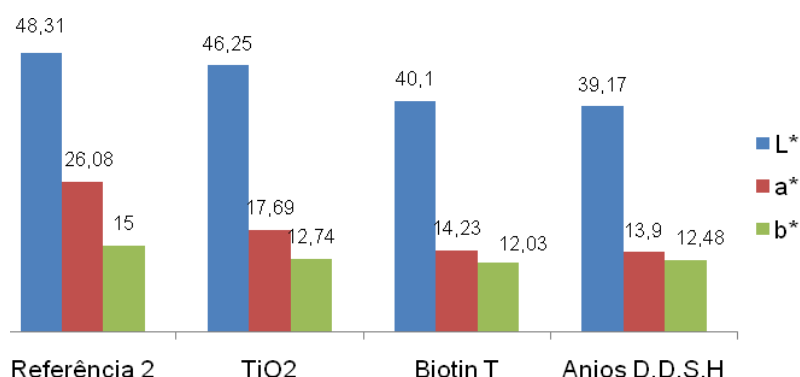


Fig. 20 – Parâmetros colorimétricos obtidos após 2 semanas de aplicação dos tratamentos, no Terraço D. Carlos

Como se verifica, em ambas as zonas seleccionadas (Fig 19 e 20), mas principalmente no Terraço D. Carlos (Fig 20), na aplicação do tratamento com TiO₂, os parâmetros colorimétricos, após 2 semanas de aplicação aproximaram-se mais aos exibidos pela superfície original da zona seleccionada (*Referência*). No Pátio dos Arcos,

a aplicação do biocida convencional, Biotin T apresentou resultados satisfatórios, (Fig 19) enquanto que o biocida Anios D.D.S.H não revelou nenhuma alteração significativa dos parâmetros $L^*a^*b^*$ antes e após a aplicação do produto (Anexo XIV). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos nos testes laboratoriais, tendo o biocida Biotin T sido muito mais eficaz na eliminação dos microrganismos do que o biocida Anios D.D.S.H.

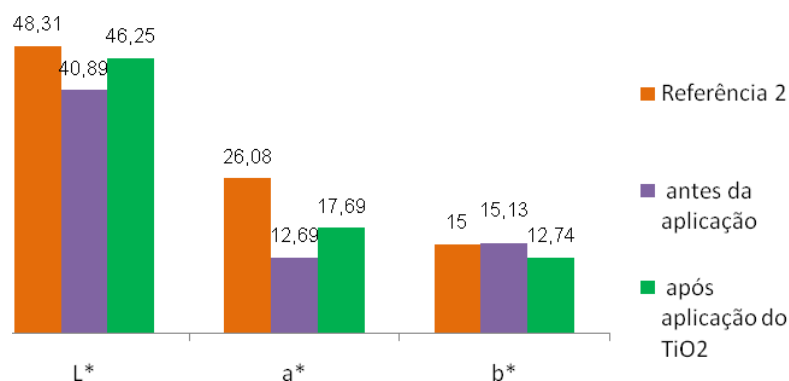


Fig. 21 – Parâmetros colorimétricos obtidos antes da aplicação, após 2 semanas de aplicação do TiO₂ e para a coloração original das paredes do Terraço D. Carlos (Referência 2).

Após a análise da Fig 21, verifica-se que a aplicação do tratamento com TiO₂ fez com que o parâmetro L* aumentasse (+6), traduzindo o ganho em luminosidade e brilho da superfície, após a aplicação do tratamento. O aumento da luminosidade deve-se sobretudo ao desaparecimento da matéria orgânica, de tonalidade mais escura (bactérias e fungos), aproximando-se do valor de L* exibido pela coloração original da superfície. O aumento do parâmetro de croma a* (que varia de -60 verde, até +60, vermelho), após a aplicação do tratamento, é igualmente significativo e relaciona-se com a diminuição da tonalidade verde, correspondente à eliminação de microrganismos fotossintéticos, e o aumento da tonalidade rosa/avermelhada própria da coloração original do reboco nesta zona. Relativamente ao parâmetro b*, este diminui ligeiramente após a aplicação do tratamento, não sendo contudo responsável por nenhuma alteração cromática significativa.

O cálculo da variação total de cor (ΔE^*), permitiu também analisar a eficácia dos tratamentos. A seguinte tabela apresenta os valores de ΔE^* para os diferentes tratamentos aplicados:

Tabela 7- Valores de ΔE^* , calculados a partir dos parâmetros $L^*a^*b^*$, antes e após 2 semanas de aplicação dos tratamentos nas diferentes zonas seleccionadas.

Local	Tratamento	$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$
Pátio dos Arcos	TiO ₂	12,19
	Biotin T	7,76
	Anios D.D.S.H	5,08
Terraço D. Carlos	TiO ₂	7,78
	Biotin T	5,42
	Anios D.D.S.H	3,70

Como se pode observar nesta tabela, a maior variação de cor total, antes e após a aplicação dos tratamentos, é verificada para o tratamento com TiO₂ em ambas as zonas seleccionadas, confirmando a eficácia deste tratamento. Pelo contrário o tratamento com o biocida Anios D.D.S.H foi o menos eficaz, demonstrando uma menor alteração de cor.

De acordo com os resultados da análise de variância ANOVA ($p=0,05$), os parâmetros L* e a* são significativamente diferentes ($p<0,05$), antes e após a aplicação do tratamento com TiO₂ (Anexo XV). Esta

diferença significativa dos parâmetros L^* e a^* verifica-se apenas para o tratamento com TiO_2 em ambas as zonas seleccionadas. Desta forma pode concluir-se que o tratamento com TiO_2 foi eficaz, sendo o produto químico que maior variabilidade apresentou, antes e após a aplicação dos tratamentos (Anexo XV), e maior proximidade com a coloração original das superfícies seleccionadas exibiu. O registo fotográfico das áreas onde foram aplicados estes tratamentos, antes e após a sua aplicação, encontra-se no Anexo XVI.

4. Conclusões

Ambas as técnicas de quantificação da clorofila *a* (espectrofluorimetria com fibra óptica e método de extracção) permitiram avaliar a eficácia dos tratamentos aplicados em laboratório. Nos testes realizados *in situ* no Palácio Nacional da Pena, conclui-se que as medições colorimétricas, segundo o modelo CIELAB são eficazes na avaliação e comparação dos diferentes tratamentos.

Após a avaliação dos resultados obtidos quer em laboratório, quer *in situ*, conclui-se que a aplicação do TiO_2 a materiais de construção constitui um tratamento eficaz na prevenção e/ou eliminação da biodeterioração. Em laboratório, a metodologia de aplicação do TiO_2 através da adição deste fotocatalisador aos restantes componentes de fabrico das argamassas ($\text{TiO}_{2\text{misturado}}$), foi a metodologia mais eficaz na eliminação dos microrganismos presentes nos provetes. Através das técnicas de quantificação da clorofila *a*, verificou-se a eliminação das culturas inoculadas, comprovando a acção fotocatalítica deste composto.

Devido aos resultados controversos obtidos para o tratamento de TiO_2 dopado com Fe^{+3} , é de esperar que as investigações científicas relativas aos métodos de dopagem com catiões metálicos prossigam até se encontrar um método eficaz para a utilização eficaz do TiO_2 à radiação da luz visível.

Relativamente aos produtos biocidas, quer nos testes laboratoriais, quer nos testes *in situ*, o produto Biotin T foi muito mais eficaz, na eliminação da colonização biológica presente, do que o produto Anios D.D.S.H.

Conclui-se assim que o TiO_2 apresenta resultados mais satisfatórios na prevenção e/ou eliminação da biodeterioração dos materiais que os produtos biocidas testados.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam uma abordagem inovadora para o controlo da biodeterioração em materiais de construção, na medida em que se pode agora começar a apostar em materiais inteligentes, auto-sustentáveis e compatíveis com o meio ambiente. Para além dos benefícios anteriormente referidos, a aplicação de fotocatalisadores a/em materiais de construção, poupará tempo e dinheiro gasto em operações de limpeza e manutenção dos revestimentos exteriores, uma vez que se trata de tratamentos preventivos e de baixo custo. Apesar dos estudos ainda necessários para desenvolver aplicações duráveis e eficientes, o potencial da nanociência aplicada à conservação do património cultural assume-se como um compromisso tecnológico promissor e industrialmente exequível.

5-Perspectivas Futuras

Para o cumprimento de várias exigências requeridas, é necessário que as argamassas apresentem características e propriedades adequadas. Assim, para completar esse estudo será necessário investigar o comportamento físico e mecânico destas argamassas incorporadas com TiO_2 na sua composição.

Dependendo da função que a argamassa irá desempenhar e do local onde vai ser aplicada, é fundamental o estudo pormenorizado deste tipo de argamassas, para que se estabeleçam as exigências requeridas para a sua aplicação. A aplicação do TiO_2 em argamassas de diferentes composições e distribuições volumétricas permitirá avaliar a influência deste composto no comportamento das argamassas. O estudo de novos processos de incorporação do TiO_2 puro ou dopado, a outros materiais de construção, tais como o betão e pedra artificial e natural durante um período de tempo considerável (de modo a determinar a durabilidade e necessidade de reaplicação do tratamento), assume-se também como uma perspectiva futura de continuação desta investigação.

6-Bibliografia

- [1]. Kurth, J. C., *Mitigating biofilm growth through the modification of concrete design and practice* MD, Georgia Institute of Technology, 2008.
- [2]. Miller, A. Z., Laiz, L., Gonzalez, J. M., Dionísio, A., Macedo, M. F., Saiz-Jimenez, C., "Reproducing stone monuments photosynthetic-based colonization under laboratory conditions" *Science of the total environment* **405** (2008) 278-285.
- [3]. Tomaselli, L., Lamenti, G., Tiano, P., Bosco, M. "Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments" *International Biodeterioration and Biodegradation* **46** (2000) 251-258
- [4]. Gaylarde, C., Gaylarde, P. M., "A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America" *International Biodeterioration and Biodegradation* **55** (2005) 131-139.
- [5]. Miller, A., Dionísio, A., Macedo, M. F., "Primary bioreceptivity: A comparative study of different Portuguese lithotypes" *International Biodeterioration & Biodegradation*, **57** (2006) 136-142.
- [6]. Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., Hasenkoglu, I. "The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey" *Science of the total environment* (2005)
- [7]. Caneva, G.; Nugari, M. P., *Biology in the conservation of Works of art*, ICCROM, Roma (1991).
- [8]. Paulus, W., (ed), *Directory of Microbicides for the protection of materials*, Springer, Dordrecht (2005).
- [9]. Gaylarde, C., Ribas Silva, M., Warscheid, Th., "Microbial impact on building materials: an overview" *Materials and Structures* **36** (2003) 342-352.
- [10]. Herrera, L. K., Videla, H. A., "The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials" *International Biodeterioration & Biodegradation* **54** (2004) 125-134
- [11]. Saiz-Jimenez, C. "Biogeochemistry of Weathering Processes in Monuments". *Geomicrobiol J* **16** (1999) 27-37.
- [12]. Crispim, C. A., Gaylarde, C. C. "Cyanobacteria Biodeterioration of Cultural heritage : a review." *Microbial Ecology* **49** (2005) 1-9.
- [13]. Ortega, J., Arino, X., Hernandez, M., Saiz-Jimenez, C., "Factores affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms" *Science Total Environment* **167** (1995) 329-341.
- [14]. Caneva, G., Di Stefano, D., Giampaolo, C., Ricci, S., (2004) Stone Cavity and Porosity as a limiting factor for biological colonisation: The travertine of lungotevere (Rome); Proceedings of the 10th Int. Congress on Deterioration and Conservation of stone, Stockholm, 2004
- [15]. Bartolini, M., Ricci, S., Del Signore, G., "Release of photosynthetic pigments from epilithic biocenosis after biocide treatments" Proceedings of the 10th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone; 27 June- 2 July 2004; Stockholm ICOMOS; p 519-526.
- [16] – Perez Zurita, Y., Cultrone, G., Sánchez Castillo, P., Sebastián, E., Bolívar F. C., "Microalgae associated with deteriorated stonework of the fountain of Bibatauin in Granada, Spain" *International Biodeterioration and Biodegradation* **55** (2005) 55-61.
- [17]. Tiano, P., "Biodeterioration of Cultural Heritage" *Sci Tech Cult Herit* **7** (1998) 19-38.
- [18]. Caneva, G.; Nugari, M.P.; Pinna, D.; Salvadori, O. (1996) *Il Controllo del degrado biologico – i biocidi nel restauro dei materiali lapidei*. Nardini Editore: Fiesole
- [19]. Nugari, M. P.; Salvadori, O., *Biodeterioration control of cultural heritage: Methods and products*, Swets & Zeitlinger, Lisse (2003)

- [20]. Ascaso, C., Wierzechos, J., Souza-Egipsy, V., De los Rios, A., Rodrigues, J. D., "In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jerónimos Monastery (Lisbon)" *International Biodeterioration and Biodegradation* **49** (2002) 1-12.
- [21]. Kumar, R & A, *Biodeterioration of stone in Tropical Environments, Research in Conservation*, The Getty Conservation Institute, USA (1999)
- [22]. Blazquez, A. B., Lorenzo, J., Flores, M., Gómez-Alarcón, G., "Evaluation of the effect of some biocides against organisms isolated from historic monuments", *Aerobiologia* **16** (2000) 423-428.
- [23]. Russel, A. D., and Chopra, I. 1990 Understanding antibacterial action and resistance. Horwood Ltd. Chichester.
- [24]. Kelerher, J., Bashant, J., Heldt, N., Johnson, L., Li, Y., Photo-catalytic preparation of silver-coated TiO₂ particles for antibacterial applications, *Journal of Microbiology & Biotechnology* **18** (2002) 133-139
- [25]. Fu, G., Vary, P. S., Lin, C., "Anatase TiO₂ Nanocomposites for Antimicrobial Coatings", *Journal Phys. Chem B* **109** (2005) 8889-8898.
- [26]. Chen, X., *Synthesis and investigation of novel materials for improved photocatalysis*, PhD Dissertation, Case Western Reserve University (2005).
- [27]. Fujishima, A., Honda, K., "Electrochemical photolysis of water at semiconductor electrode" *Nature* **238** (1972) 8-37.
- [28]. Beydoun, D., AMAL, R., LOW, G., MCEVOY, S., The role of nanoparticles on photocatalysis, *Journal of Nanoparticle Research*. (1999) 439-458.
- [29]. Sunada, K., Watanabe, T., Hashimoto, K., "Bactericidal Activity of Copper Deposite TiO₂ thin film under weak UV illumination" *Environmental Science Technology* **37** (2003) 4785-4789.
- [30] – Litter, M. I., Navío, J. A., "Photocatalytic properties of iron-doped titania semiconductors" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **98** (1996) 171-181
- [31]. K. Qi., X. Chen, Y. Liu, J. Xin, C. L. Mak, W. *Journal of Materials Chemistry*, **17** (2007) 3504-3508.
- [32]- Chen, J., Poon, C., "Photocatalytic construction and building materials: From fundamentals to applications" *Building and Environment* **44** (2009) 1899-1906.
- [33]. Yanfang, S., Xiong, T., Li, T., Yang, K., "Tungsten and nitrogen co-doped TiO₂ nanopowders with strong visible light response" *Applied Catalysis B: Environmental* **83** (2008) 177-185.
- [34]- Claesson, S., Engstrom, L. (ed), *Solar energy – Photochemical conversion and storage*, National Swedish board for Energy source development, Stockholm (1977).
- [35]- Kashif, N., Ouyang, F., "Parameters effect on heterogeneous photocatalysed degradation of phenol in aqueous dispersion of TiO₂" *Journal of Environmental Sciences* **21** (2009) 527- 533
- [36]. Carp, O., Huisman, C.L., Reller, A., "Photoinduced reactivity of titanium dioxide" *Progress in Solid State Chemistry* **32** (2004) 33-177.
- [37]. Zhang, X., Fujishima, A., Jin, M., Emeline, A. V., Murakami, T., "Double-Layered TiO₂-SiO₂ Nanostructured films with self-cleaning and antireflective properties". *Journal Phys. Chem B* **110** (2006) 25142-25148.
- [38]. N. P. Mellott, C. Durucan, C. J. Pantano, M. Guglielmi, *Thin solid films* **50** (2006) 112-120.
- [39]. Roméas, V., Pichat, P., Guillard, C., Chopin, T., Lehaut, C., "Testing the efficacy and the potencial effect on indoor air quality of a transparent self-cleaning TiO₂-coated glass through the degradation of a fluoranthene layer", *Materials and Interfaces* **38** (1999) 3878-3885.
- [40]. Diamanti, M. V., Brunella, M. F., Pedferri, M. P., Pirota, C., Manzocchi, P., Curtoni, S., "Self-cleaning and antipolluting properties of TiO₂-containing cementitious materials" in *Nanotech*, May 2007.

- [41]. Silva., S. "Caracterização de argamassas antigas - casos paradigmáticos", in *Cadernos edifícios 02-Revestimentos de paredes em edifícios antigos*. LNEC, Lisboa (2002).
- [42]. Haarstrick, A., Oemer, M., Heinzle, E and K., "TiO₂-Assisted Degradation of Environmentally Relevant Organic Compounds in Wasterwater Using a Nover Fluized Bed Photoreactor", *Environ. Sci. Technol* **30** (1996) 817-824.
- [43]. Návio, J. A., Macias, M., García-Gómez, M., Pradera, M.A., "Functionalisation versus mineralisation of some N-heterocyclic compounds upon UV-illumination in the presence of un-doped and iron-doped TiO₂ photocatalysts", *Applied Catalysis B:Environmental* **82** (2008) 225-232.
- [44]. Tomaselli. L., Lamenti, G., Tiano, P., "Chlorophyll fluorescence for evaluating biocide treatments against phototrophic biodeteriogens" *Ann Microbiol* **52** (2002) 197-206.
- [45]. Vollenweider, R. A., *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1974).
- [46]. Adán, C. Bahamonde, A., Fernández, M., Martínez-Arias, A., "Structure and activity of nanosized iron-doped anatase TiO₂ catalysts for phenol photocatalytic degradation" *Applied Catalysis B: Environmental* **72** (2007) 11-17.
- [47] – Asilturk, M., Sayilkan, F., Arpaç, E., "Effect of Fe⁺³ doping to TiO₂ on the photocatalytic degradation of Malachite Green dye under UV and vis-irradiation", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **203** (2009) 64-71.
- [48]. Chuan, X., Hirano, M., Inagaki, M., "Preparation and photocatalytic performance of anatase-mounted natural porous silica, pumice, by hydrolysis under hydrothermal conditions" *Applied Catal B: Environmental* **51** (2004) 255-260
- [49]- Faria, P., Henriques, F.A., Rato, V.M., *Argamassas Correntes: Influência do Tipo de Ligante e do Agregado*
- [50]- Veiga, R.M., *As argamassas na Conservação in Actas das 1ªas Jornadas de Engenharia Civil da Universidade de Aveiro*, LNEC, Lisboa 2003.
- [51]- Pereira, T. A. R., "Optimização das características de humedecimento e secagem de argamassas" *Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa*, Lisboa 2008.

Anexos

Anexo I – Especificação técnica dos produtos químicos seleccionados

Produto Químico: Dióxido de Titânio, **TiO₂**

Especificação: AEROXIDE® TiO₂ P25 da Degussa Corporation; Spec nº 1261/1

Especificação técnica

Características físico-químicas	Unidades	Valores Típicos
Área específica superficial (BET)	m ² /g	50 (35-65)
Tamanho médio de partícula	nm	21
Quantidade de TiO ₂	%	> 99,50
Quantidade de Al ₂ O ₃	%	< 0,300
Quantidade de SiO ₂	%	< 0,200
Quantidade de Fe ₂ O ₃	%	<0,100
Quantidade de HCl	%	<0,300

Produto Químico: **Biotin T**

Especificação: Biotin T, C.T.S. ® España - Productos y Equipos para la Restauración

Especificação técnica

Aspecto	Líquido incolor a amarelo
Densidade a 20°C	0,94 g/ml
Viscosidade dinâmica	50mPa. s
Ponto de solidificação	<-5°C
Estabilidade	Tº (-5°C/+80°C) pH (5-9)
Mistura	Recomenda-se 2% em água destilada
Compatibilidade	Limitada com tensioactivos aniónicos

Produto Químico: **Anios DDSH**

Especificação: Anios DDSH- ®1086000 Laboratories Anios

Especificação técnica

Estado Físico	Líquido Fluido
pH da substância	neutro
Densidade	< 1
Hidrossolubilidade	diluível
Ponto de inflamação	41,5 ± 1°C

Anexo II – Constituição e execução dos provetes das argamassas

Para um entendimento mais simples da constituição de ambas as argamassas estudadas neste trabalho apresenta-se a seguinte tabela:

Tabela 1 – Constituição das argamassas

Argamassa		Composição	
Tipo	Sigla adoptada	Dosagem volumétrica	Constituintes
Bastardas de cal aérea hidratada e cimento	AC	12:4:1	Areia de Corroios: cal aérea hidratada em pó: cimento branco
	AQz	12:4:1	Areia siliciosa: cal aérea hidratada em pó: cimento branco

Procedimento para a execução das Argamassas

Em primeiro lugar, executaram-se, em madeira, os moldes prismáticos (4,5 x 4,5 x 2 cm) das argamassas.

Para o fabrico das argamassas, a massa de todos os componentes foi determinada numa balança de laboratório de modo a fazer a conversão para traços volumétricos (apresentados na Tabela 1).

Em seguida, a areia e os ligantes foram misturados a seco num recipiente metálico com uma colher de pedreiro, de modo a homogeneizar todos os componentes. O processo de mistura foi efectuado manualmente, com a colher de pedreiro, durante cerca de 2 minutos. Quando o processo de homogeneização ficou concluído, adicionou-se água e amassou-se a pasta até se obter um nível de plasticidade considerado ideal.

Por último, foram preenchidos os moldes de madeira. Com a ajuda de uma pequena colher, compactaram-se as argamassas, alisando a superfície e removendo os excessos

Condições de cura das argamassas:

O processo de cura é muito importante para o desempenho das argamassas.

Depois da moldagem dos provetes, estes foram acondicionados numa sala de ambiente controlado ($T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{HR} = 50 \pm 5\%$), durante 7 dias; depois, foram desmoldados e permaneceram a curar durante cerca de 50 dias.

Anexo III – Características mineralógicas e propriedades físicas dos materiais de construção seleccionados

Argamassas

1.1 – Agregados

Agregado- Ampliação 4x	Descrição microscópica e principais características
 <p>Referência: Areia Barreira 0/4 – P. C Cunha 3</p>	<p>A areia de Corroios/pinhal foi cedida pela empresa <i>Grupo Soarvamil</i>, com origem nas explorações de Foros de Amora e Coina.</p> <p>Por análise ao microscópio, observam-se partículas de areia gomada de grãos subangulosos e subarredondados. Segundo as informações técnicas adquiridas pela empresa, os principais constituintes desta argamassa são: quartzo, quartzito, feldspato, xisto e moscovite</p>
 <p>Referência: Apas 20</p>	<p>A areia de quartzo foi cedida pela empresa Areipor (Bucelas).</p> <p>Segundo as informações técnicas, este agregado é bastante fino e predominantemente silicioso, contendo um teor de $\text{SiO}_2 > 96 \%$.</p> <p>As areias comercializadas pela firma são cuidadosamente lavadas.</p> <p>Por observação ao microscópio, verifica-se a presença de partículas de areia não gomada, de grãos arredondados de aparência limpa e translúcida</p>

1.2 – Cal hidratada em pó

Ca(OH)_2 M= 74,09 g/Mol Riedel-de Haen 31219

Características Químicas	
Cu	0,0005%
Fe	0,05%
Cl	0,005%
SO₄	0,05%
Pb	0,0002%
Zn	0,0005%

1.3- Cimento

Cimento Branco de Portland (CEM II/ B-L 32,5 R (br)

Características Químicas		
Propriedades	Método de Ensaio	Valor Especificado
Teor de Sulfatos (SO ₃)	NP EN 196-2	<3,5%
Teor de Cloretos	NP EN 196-21	<0,10%

Características Mecânicas		
Resistência à Compressão		
Resistência aos primeiros dias	Resistência de referência	
2 dias	7 dias	28 dias
➤ 10	-	> 32,5 e < 52,5

Características Físicas		
Propriedades	Método de Ensaio	Valor Especificado
Princípio da Presa	NP EN 196-3	➤ 75 min
Expansibilidade	NP EN 196-3	< 10 min

Anexo IV - Cálculos realizados para a aplicação dos tratamentos com TiO₂

• Imobilização do TiO₂ nas partículas de areia da argamassa siliciosa

O procedimento para a imobilização de TiO₂ em partículas de areia foi anteriormente descrito na literatura científica [42], mas não foi, até agora feita qualquer referência à aplicação dessas partículas de areia no fabrico de argamassas.

Cálculos realizados

De modo a imobilizar o TiO₂ em toda a superfície específica da partícula de areia de quartzo realizaram-se os seguintes cálculos:

Dados da areia de quartzo:

Raio de uma partícula de areia = 0,3 mm ; 3×10^5 nm

Massa da areia (para 6 provetes) = 180 g

Densidade da areia (quartzo) = 2,65

Volume de 1 partícula de areia =?

$$V_{\text{esfera}} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$V_{\text{partícula de areia}} = \frac{4}{3} \pi (3 \times 10^5)^3$$

$$V_{\text{partícula de areia}} = 1,13 \times 10^{17} \text{ nm}^3$$

Qual o volume total da areia (180 g)?

$$\frac{2,65 \text{ g} - 1 \text{ cm}^3}{180 \text{ g} - x}$$

$$V_{\text{total}} = 68 \text{ cm}^3 = 6,8 \times 10^{22} \text{ nm}^3$$

Qual o nº total de partículas de areia?

$$V_{\text{total das partículas}} / V_{\text{partícula de areia}}:$$

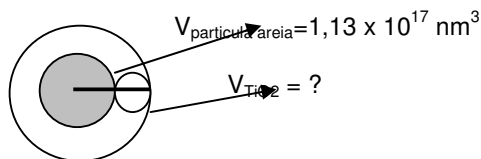
$$6,8 \times 10^{22} \text{ nm}^3 / 1,13 \times 10^{17} \text{ nm}^3 = 6 \times 10^5 \text{ partículas de areia}$$

Dados do TiO₂ (P25 - anatase) Degussa

Tamanho médio de partícula de TiO_2 = 21 nm

Densidade da anatase = 3,8

Volume de TiO_2 imobilizado na partícula de areia = ?



$V_{\text{revestimento}_{\text{TiO}_2}} = v(\text{TiO}_2 + \text{partícula de areia}) - v(\text{partícula de areia})$

$$V_{\text{TiO}_2} = \frac{4}{3} \pi ((300021)^3 - (3 \times 10^5)^3)$$

$$V_{\text{TiO}_2} = 2,4 \times 10^{13}$$

$$V_{\text{TiO}_2 \text{ total}} = 2,4 \times 10^{13} \times (6 \times 10^5 \text{ partículas de areia}) = 1,42 \times 10^{19} \text{ nm}^3$$

$$1,42 \times 10^{19} \text{ nm}^3 = 14,2 \text{ mm}^3$$

Qual a quantidade de TiO_2 necessária para revestir 180 g de areia?

$$3,8 \text{ g} - 1000 \text{ mm}^3$$

$$x - 14,2 \text{ mm}^3$$

$$x = 0,054 \text{ g} = 54 \text{ mg de TiO}_2$$

Procedimento realizado

Inicialmente adicionou-se 2-propanol à areia de quartzo. Seguidamente juntou-se uma pequena quantidade de TiO_2 e agitou-se a solução. Após filtragem da solução deixou-se a areia a secar.

No dia seguinte a areia foi aquecida a 400°C durante 1 hora de modo a imobilizar o TiO_2 .

Com a areia já revestida efectuaram-se as argamassas de areia de quartzo com $\text{TiO}_{2\text{imobilizado}}$.

• Dopagem metálica do TiO_2

TiO_2 P25 Degussa

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich®)

Cálculos realizados:

Para realizar o processo de dopagem do TiO_2 com Fe^{+3} a 0,5 wt%, calculou-se inicialmente a massa molar do TiO_2 e a massa atômica do Fe

Massa molar (Mm) TiO_2 = 79,89 g/mol

Massa atômica (ma) do Fe = 55,85

De modo a obter uma composição de Fe a 0,5wt% e TiO_2 (99,5wt%) realizaram-se os seguintes cálculos para determinar a massa molar (mm) do novo composto dopado ($\text{TiO}_2\text{-Fe}$):

$$55,847 \text{ (ma Fe)} \times 0,005 = 0,279$$

$$79,89 \text{ (mmTiO}_2) + 0,279 = 79,907 \text{ (mm TiO}_2\text{-Fe)}$$

Calculada a massa molar do composto $\text{TiO}_2\text{-Fe}$ com Fe a 0,5wt%, determinou-se a quantidade de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ necessária para o processo de dopagem:

$$\text{Mm} (\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}) = 403,9 \text{ g/mol}$$

$$\% \text{Fe} = \text{Ma} (\text{Fe}) / \text{Mm} (\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O})$$

$$\% \text{Fe} = 55,85 / 403,9 = 13,82 \%$$

Para ter 0,5% de Fe:

$$13,82 \% - 403 \text{ g}$$

$$0,5 \% - x \text{ gr}$$

Onde o valor de $x = 14,616 / 100 = 0,14616$ gr de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ para ter 79,907 g de $\text{TiO}_2\text{-Fe}$

Assim, para obter 15 g de $\text{TiO}_2\text{-Fe}$ (quantidade necessária para a realização das argamassas):

$$79,907 \text{ g TiO}_2\text{-Fe} - 0,14616 \text{ g Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$$

$$15 \text{ g} - x \text{ g Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$$

Onde o valor de $x = 0,02744$ g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

Procedimento Experimental

O procedimento experimental realizado baseou-se nas indicações descritas em [43].

Inicialmente impregnou-se o TiO_2 (15 g) numa solução aquosa de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, que continha já a quantidade de Fe a 0,5 wt%.

Esta solução ficou a repousar durante 48 horas. Após este período aqueceu-se a solução a 110°C , durante 12 horas de modo a evaporar toda a água presente. O soluto obtido foi seguidamente aquecido a 500°C durante 24h e posteriormente adicionado no fabrico das argamassas

Anexo V – Registo Fotográfico logo após a inoculação dos provetes

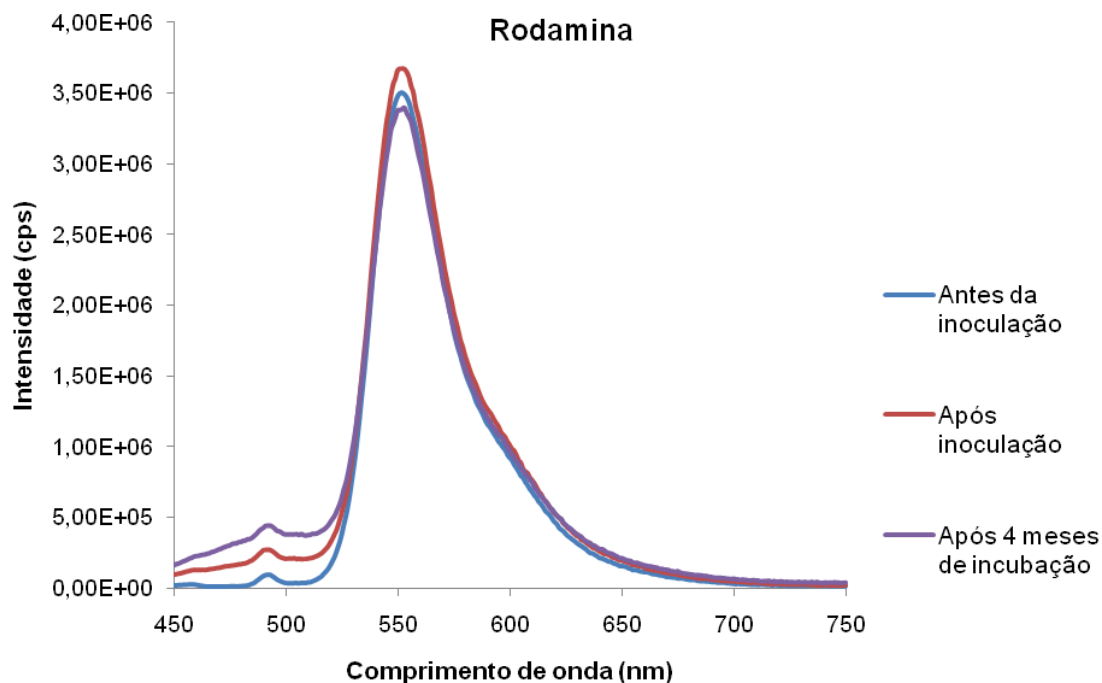


Fig 1. Argamassa de areia de quartzo logo após a inoculação



Fig 2. Argamassa de areia de Corroios, logo após a inoculação

Anexo VI – Espectros de emissão de fluorescência da Rodamina, durante o período de incubação



Anexo VII – Protocolo para a quantificação da clorofila a e feofitina a por espectrofluorimetria

Materiais e reagentes necessários:

- martelo
- pano de camurça
- frasco Schot
- kitasatu
- funil de filtração (47 mm)
- Copo de filtração de solventes (usado em HPLC)
- disco de filtração
- filtros Supelco (Nylon 66 membranes, 0,45 μ m x 47 mm)
- mola e borracha de fixação do funil
- pinça
- papel de alumínio
- tubos de centrifuga (10 ml)
- DMSO (dimetil sulfóxido)
- 1M HCl

Procedimento Experimental:

1. Fracturar o provete, envolvido num pano de camurça, com um martelo até obter fragmentos pequenos (0,20-0,50 cm³).
2. Colocar os fragmentos em frascos Shot e adicionar DMSO (dependendo do peso do provete; aproximadamente 1 ml de DMSO por g de substrato)
3. Adicionar o mesmo volume de DMSO num frasco Schot (branco)
4. Incubar os frascos numa estufa a 65° durante 1 hora para eluir os pigmentos.
5. Filtrar a solução contendo os pigmentos numa montagem de filtração semelhante à utilizada para solventes de HPLC.
6. Centrifugar o volume filtrado durante 10 m a 50 x100 rpm.
7. Efectuar leituras no espectrofluorímetro a 670 nm da amostra branco, antes (Rb branco) e após acidificação das soluções (Ra branco), na célula de fluorescência, com duas gotas de uma solução concentrada HCl (1 M).
8. Efectuar leituras no espectrofluorímetro a 670 nm, antes (Rb) e após acidificação das amostras (Ra), na célula de fluorescência, com duas gotas de uma solução concentrada HCl (1 M).

Fórmula para o cálculo da concentração de clorofila a das amostras:

$$Chla (\mu g/ml) = Fs \cdot (T-1) \cdot (Rb'-Ra') \cdot (V1/V2)$$

em que:

Rb'=Rb - Branco (Rb) (cps)

Ra'= Ra-Branco (Ra) (cps)

V1= Volume de extracção (ml) V2= Volume de amostra filtrado (ml)

Chla= clorofila a

Fs= factor de calibração

T= razão de acidificação

Anexo XVIII - Protocolo para a obtenção da recta de calibração do Espectrofluorimetro

O procedimento posteriormente descrito deverá ser efectuado em condições de baixa ou nenhuma luminosidade.

1-Determinação da concentração de Clorofila a (Chla) pura por espectrofotometria de absorção

→ **Solução A** – Diluir 1 mg de Chla pura (extraída de folhas de espinafre) em 100 ml de DMSO:

- Serrar a ampola de 1 mg de Chla pura
- Colocar a chla pura num balão volumétrico de 100 ml com a ajuda de um funil
- Lavar a ampola com DMSO e verter para o balão
- Perfazer o volume do balão com DMSO
- Homogeneizar a solução A no banho de ultrassons (intensidade máxima) durante 2 minutos
- Etiquetar e cobrir o balão com papel de alumínio

→ **Solução B** - 10 ml de solução A em 100 ml de DMSO (isto é, 1 µg/ml)

- Adicionar 10 ml da solução A num balão volumétrico de 100 ml e perfazer até 100 ml com DMSO
- Homogeneizar a solução B no banho de ultrassons (intensidade máxima) durante 2 minutos
- Etiquetar e cobrir o balão com papel de alumínio

2-Leitura da absorção das soluções A e B no espectrofotómetro:

- Adicionar DMSO numa célula de absorção (branco)
- Adicionar Solução A numa célula de absorção
- Recolher o espectro entre 400 e 800 nm no espectrofotómetro
- Anotar os valores de cps a 664 nm e 750 nm
- Adicionar 2 gotas de HCl 5% à célula com solução A e obter o espectro após acidificação
- Anotar os valores a 665 e 750 nm
- Repetir o mesmo procedimento para a solução B

Absorção a λ	Sol A	Sol B	Absorção a λ	Sol A	Sol B
664 nm			665a nm		
750 nm			750a nm		
Calculo 664b (664- 750)			Calculo 665a (665a- 750 ^a)		

3-Cálculo da concentração de clorofila a e feofitina a das soluções A e B:

$$\text{Chla } (\mu\text{g/ml}) = 26.7 \times (664b - 665a) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{Feo } (\mu\text{g/ml}) = 26.7 \times 1.7 \times (665a - 664b) = \underline{\hspace{2cm}}$$

4 - Cálculo da concentração teórica da solução B ($cv=c'v'$):

$$\text{conc solA} \times \text{vol solA} (10 \text{ ml}) = c' (\text{conc solB}) \times 100$$

5-Determinação da recta de calibração no espectrofluorímetro

a. Preparação dos padrões:

- 0.1 ml de sol. B em 10 ml de DMSO (padrão 1)
- 0,5 ml de sol. B em 10 ml de DMSO (padrão 2)
- 1 ml de sol. B em 10 ml de DMSO (padrão 3)
- 2 ml de sol. B em 10 ml de DMSO (padrão 4)
- 3 ml de sol. B em 10 ml de DMSO (padrão 5)
- ...
- 10 ml de sol. B (padrão 12)
- 0 ml de sol.B e 10 ml de DMSO (padrão 13)

b. Etiquetar os balões volumétricos

c. Homogeneizar as soluções no banho de ultrassons durante 1 minuto

d. Cobrir os balões volumétricos com papel de alumínio e etiquetar novamente

e. Definir parâmetros de medição do espectrofluorímetro:

f. Recolher o valor de emissão a **670 nm** antes (**Rb**) e após acidificação (**Ra**) para todos os padrões.

6-Elaboração da recta de calibração para Chla pura em função da emissão de fluorescência

6.1 Preencha a seguinte tabela:

Soluções	Vol de Solução B (ml)	Volume de DMSO (ml)	Volume total (ml)	Concentração teórica (µg/ml) $V_{solB} \times conc_{solB} / V_{total}$	Rb	Rb - Branco (Rb)	Ra	Ra-Branco (Ra)
Branco	0	10	10			-		-
Padrão 1			10					
Padrão ...			10					

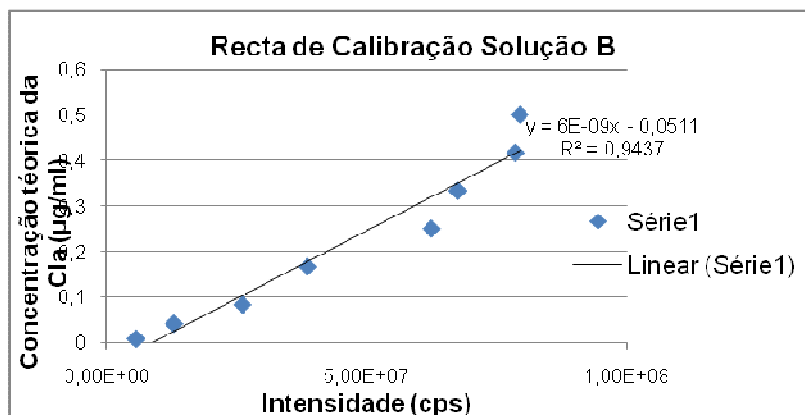
6.2 Cálculo do declive da recta (Fs) e da razão de acidificação (τ):

Fs = declive da equação da recta de calibração $\rightarrow y = mx + b$

$$\tau = Rb/Ra, \tau = \left(\frac{664b}{665a} \right) \text{ para a Chla pura} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\tau/(\tau-1) = \underline{\hspace{2cm}}$$

Recta de Calibração obtida



Parâmetros obtidos através da recta de calibração

Fs= 6E-0,9; $\tau=Rb/Ra$; $\tau = (664b/665a) = 1,7$; $\tau/(\tau-1)=2.4$

Anexo IX – Identificação da comunidade biológica presentes nas paredes do Palácio da Pena, por métodos de biologia molecular










Taxa (nº de acesso)*	% de similitude	Primer	Local
Algas Verdes			
<i>Trentepohlia</i> sp. (DQ399592)	98	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Trentepohlia</i> sp. (DQ399592)	99	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Trentepohlia</i> sp. (DQ399592)	99	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Trentepohlia</i> sp. (DQ399592)	97	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
Cloropasto de Chlorophyta	93	616F-1510R	Terraço D. Carlos
Chlorophyta	99	Cya 106F-Cya 781R	Terraço D. Carlos
Chlorophyta	98	Cya 106F-Cya 781R	Terraço D. Carlos
Cianobactérias			
Cyanobacteria	98	616F-1510R	Pátio dos Arcos
Cyanobacteria	92	616F-1510R	Terraço D. Carlos
Cyanobacteria	97	616F-1510R	Terraço D. Carlos
Cyanobacteria	94	Cya 106F-Cya 781R	Terraço D. Carlos
<i>Nostoc punctiforme</i> (DQ185258)	98	Cya 106F-Cya 781R	Terraço D. Carlos
Fungos			
Ascomycete (EU409872)	97	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Mycosphaerella</i> strain (EU167605)	98	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Capnobotryella</i> sp	99	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Ramichloridium</i> strain (EU041798)	97	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>Cercospora</i> strain (AY840527)	99	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
Ascomycete (EU409872)	96	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
m isolate (DQ681315)	96	EukA-EukB	Pátio dos Arcos
<i>ia elegans/parietina</i> (AF088254/AF	97	EukA-EukB	Terraço D. Carlos
<i>Xanthoria elegans</i> (AF088254)	97	EukA-EukB	Terraço D. Carlos
<i>Caloplaca trachyphylla</i> (DQ641412)	90	EukA-EukB	Terraço D. Carlos
<i>Xanthoria parietina</i> (AF241541)	97	EukA-EukB	Terraço D. Carlos
<i>Xanthoria elegans</i> (AF088254)	96	EukA-EukB	Terraço D. Carlos

Bactérias			
Bacterium (DQ532204)	93	616F-1510R	Pátio dos Arcos
Bacterium (DQ532204)	93	616F-1510R	Pátio dos Arcos
Bacterium (DQ532204)	94	616F-1510R	Pátio dos Arcos
<i>Sphingomonas</i> sp. (FJ429181)	94	616F-1510R	Pátio dos Arcos
ngomonadaceae endolítico (AB473	94	616F-1510R	Pátio dos Arcos
Sphingomonadaceae (AM697066)	97	616F-1510R	Pátio dos Arcos
<i>Hymenobacter</i> sp. (EU382214)	96	616F-1510R	Pátio dos Arcos
Flexibacteraceae (EU155013)	95	616F-1510R	Pátio dos Arcos
Bacterium (FJ790565)	93	616F-1510R	Pátio dos Arcos
<i>Hymenobacter</i> (AF408296)	94	616F-1510R	Terraço D. Carlos
<i>Hymenobacter</i> (AF408296)	96	616F-1510R	Terraço D. Carlos

*nº de Acesso do homólogo mais próximo do NCBI- data base

Anexo X – Observação macroscópica do desenvolvimento biológico nos provetes durante o período de incubação

Tabela 1 – Observação macroscópica do desenvolvimento biológico presente nos provetes de Argamassa de areia de quartzo (AQz) ao longo do período de incubação

Tratamento	Observação macroscópica do desenvolvimento biológico		
	Após inoculação	Após 2 meses de incubação	Após 4 meses de incubação
Sem tratamento			
TiO_2 misturado			
TiO_2 imobilizado			










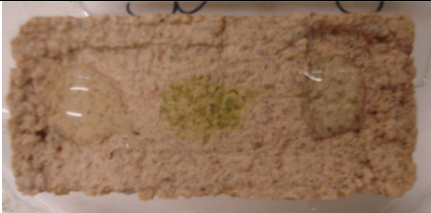



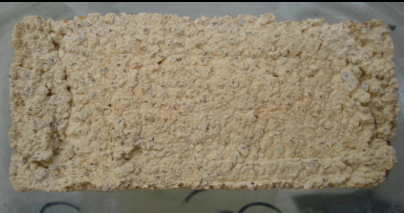







TiO₂ - Fe			
Biocidas	Após inoculação	Após 4 meses de incubação	Após 2 semanas de aplicação
Anios D.D.S.H			
Biotin T			

Tabela 2 – Observação macroscópica do desenvolvimento biológico presente nos provetes de Argamassa de areia de Corrios (AC) ao longo do período de incubação

Tratamento	Observação macroscópica do desenvolvimento biológico		
	Após inoculação	Após 2 meses de incubação	Após 4 meses de incubação
Sem tratamento			
TiO ₂ misturado			
TiO ₂ - Fe			
Biocidas	Após inoculação	Após 4 meses de incubação	Após 2 semanas de aplicação
Anios D.D.S.H			



Anexo XI – Gama de Intensidades de fluorescência média, obtidas a 683 nm, durante o período de incubação

Tabela 1 – Gama de Intensidade de fluorescência (mínima e máxima) médias, obtida a 683 nm, durante o período de incubação, para os provetes de argamassa.

Material	Tratamento Aplicado	Antes da inoculação Gama de intensidade a 683 nm	Após Inoculação Gama de Intensidade a 683 nm	Após 4 meses de incubação Gama de Intensidade a 683 nm	Após 2 semanas de aplicação de Biotin Gama de Intensidade a 683 nm	Após 2 semanas de aplicação de Anios Gama de Intensidade a 683 nm
AC	Sem tratamento	$7,2 \times 10^4 - 1,1 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5 - 5,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6 - 5,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^4 - 7,7 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4 - 2,7 \times 10^5$
	TiO ₂	$7,7 \times 10^4 - 9,2 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5 - 6,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4 - 8,7 \times 10^4$		
	TiO ₂ -Fe	$6,7 \times 10^4 - 7,8 \times 10^4$	$5,4 \times 10^5 - 6,2 \times 10^5$	$8,2 \times 10^4 - 1,2 \times 10^6$		
AQz	Sem tratamento	$9,5 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5 - 4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6 - 5,8 \times 10^6$	$9,8 \times 10^4 - 1,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5 - 2,3 \times 10^6$
	TiO ₂	$1,1 \times 10^5 - 1,2 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^6$	$8,2 \times 10^4 - 9,8 \times 10^4$		
	TiO _{2imb}	$9,0 \times 10^4 - 1,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5 - 4,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$		
	TiO ₂ -Fe	$9,7 \times 10^4 - 2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 - 1,0 \times 10^6$	$9,2 \times 10^4 - 1,2 \times 10^6$		

Anexo XII- Espectros de emissão de fluorescência, por triplicado, durante o período de incubação

- Argamassa de Areia de Quartzo (AQz)

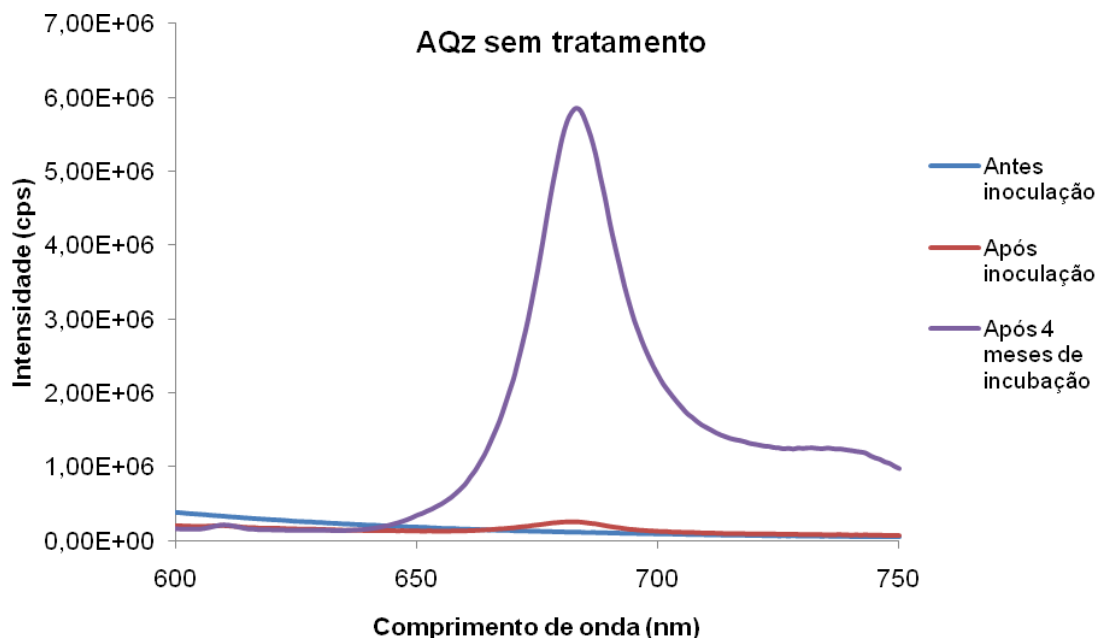


Fig 1 – Espectro de emissão de fluorescência, por triplicado, para os provetes sem tratamento

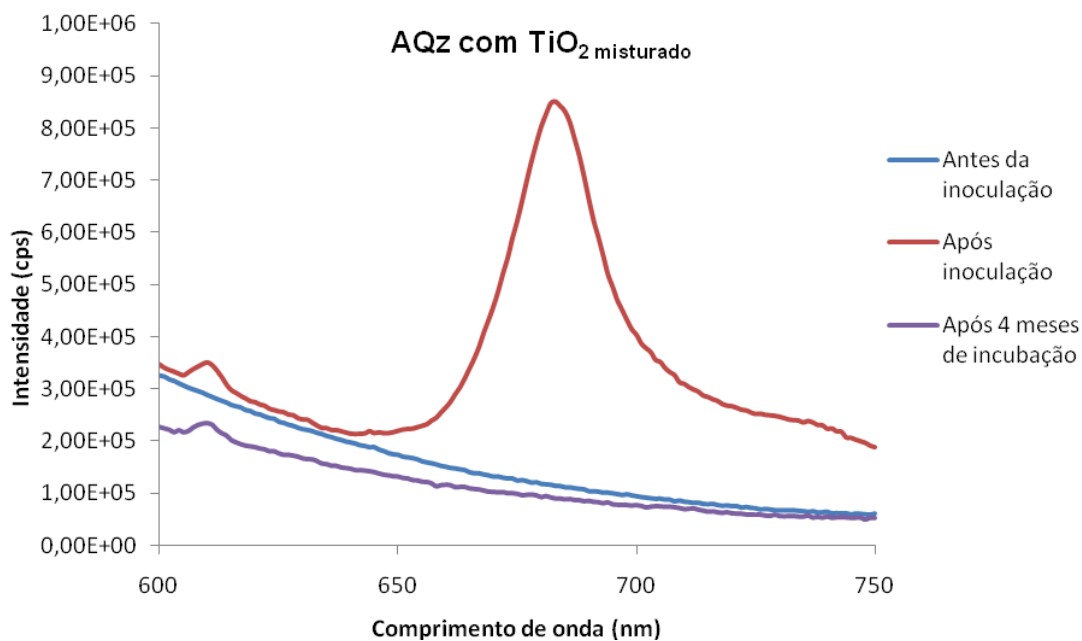
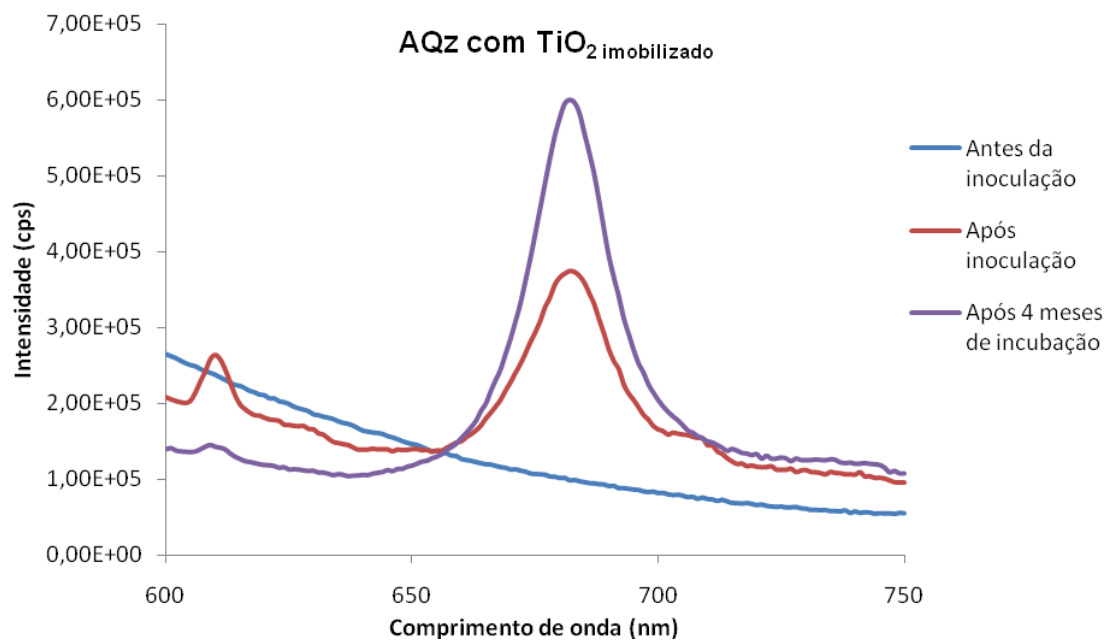


Fig 2- Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes de AQz com TiO_2



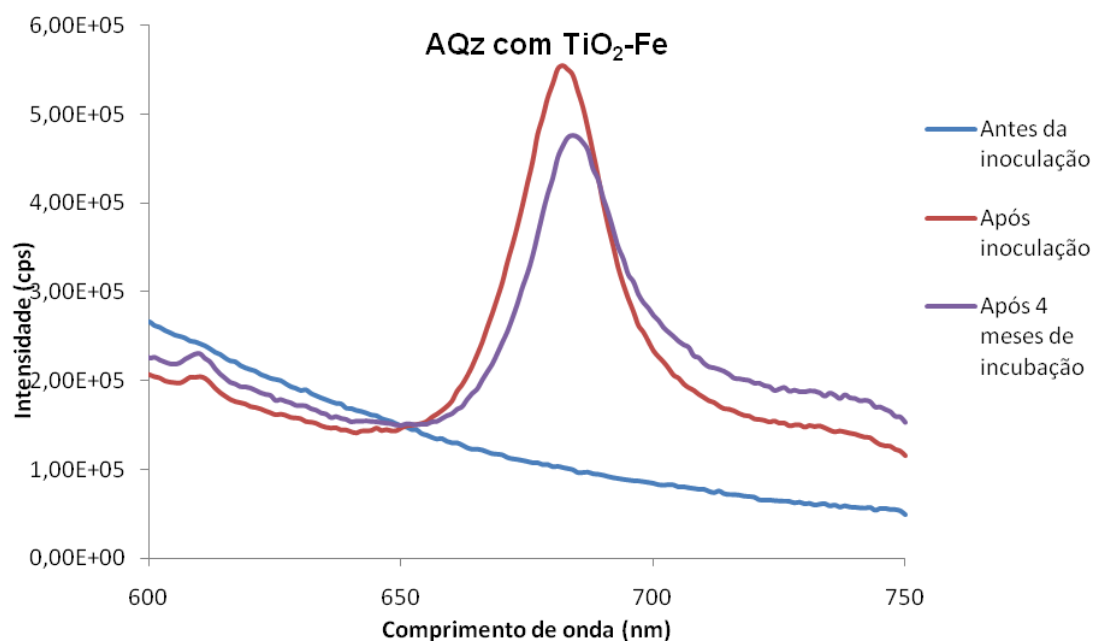


Fig 4 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes com AQz com $\text{TiO}_2\text{-Fe}$

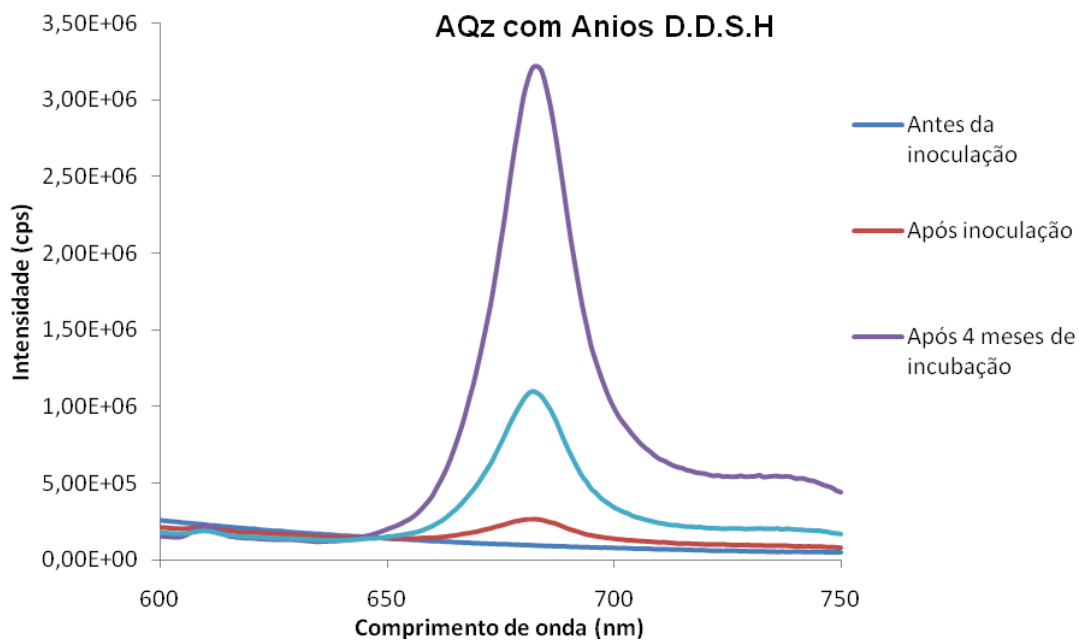


Fig 5 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes tratados com Anios D.D.S.H

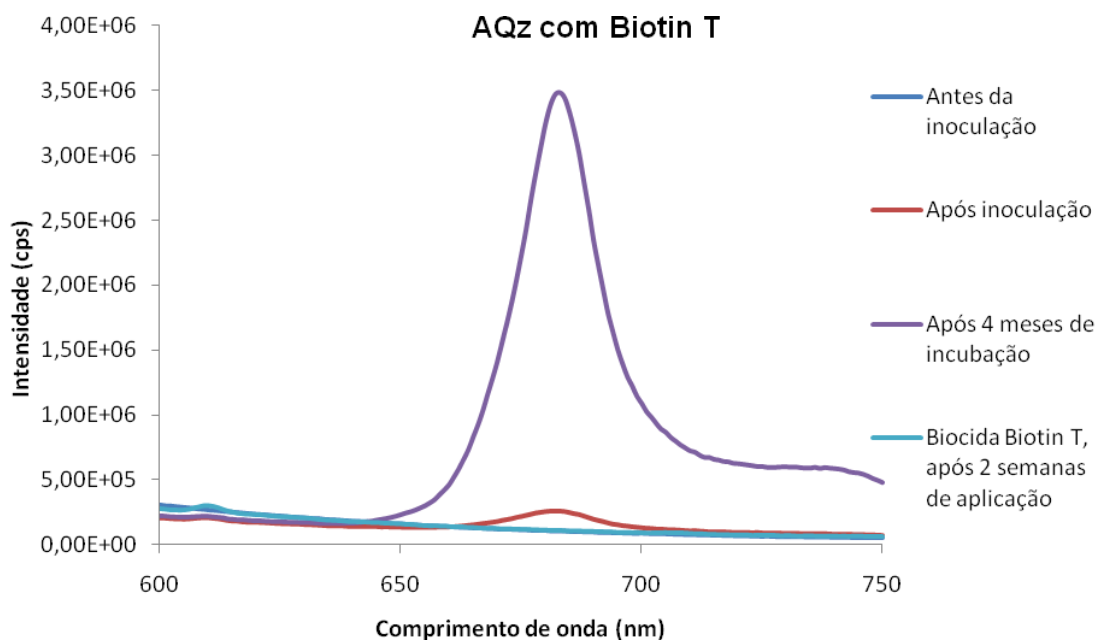


Fig 6 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes tratados com Biotin T.

- Argamassa de areia de Corroios

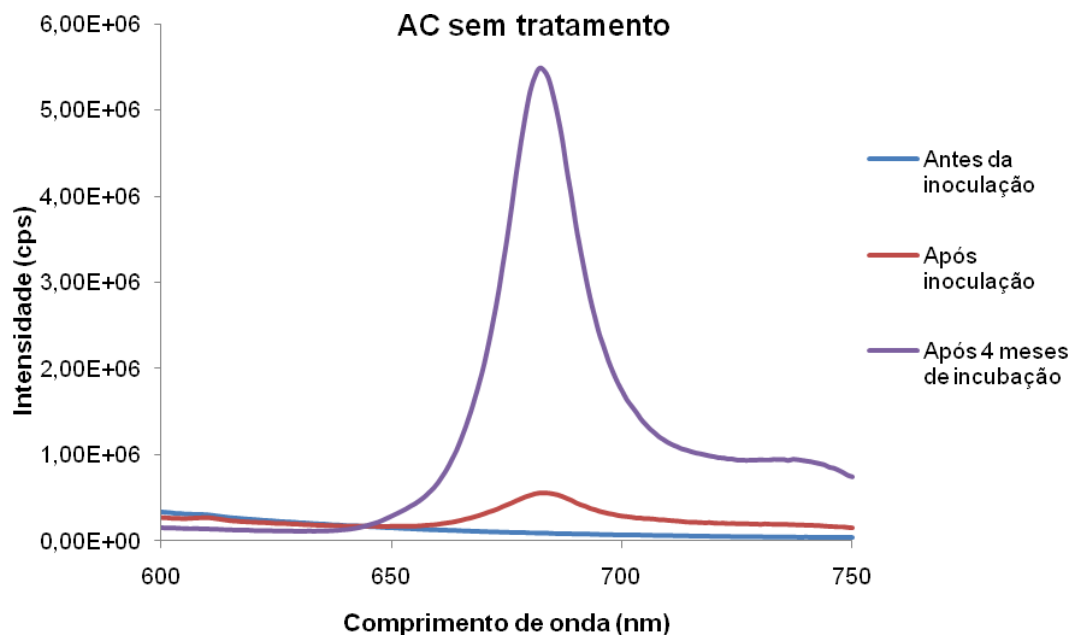


Fig 7 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes de AC sem tratamento

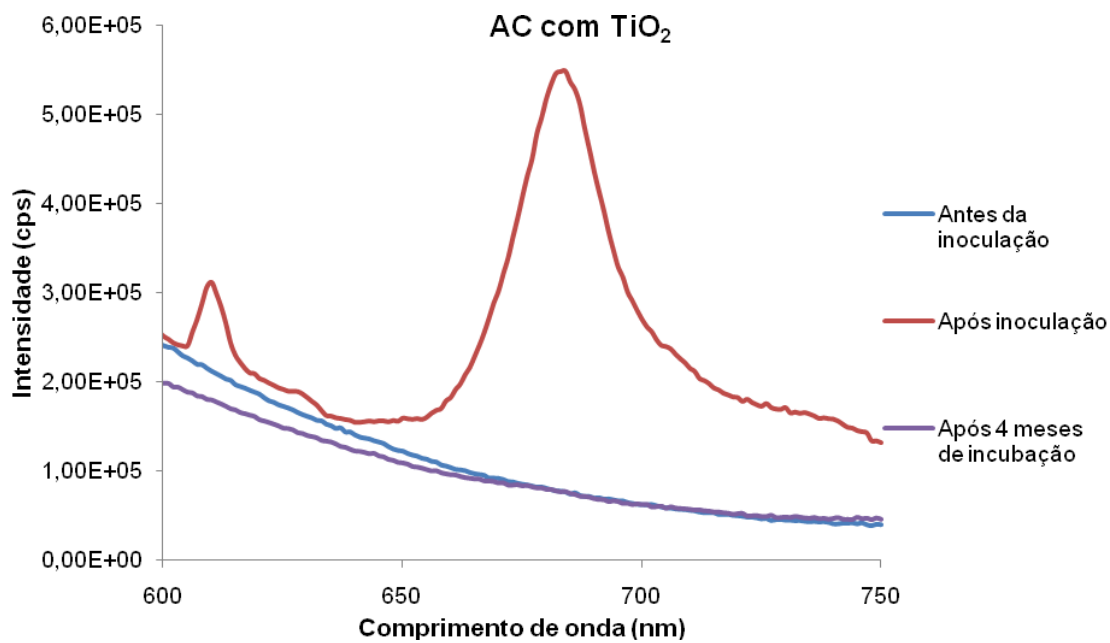


Fig 8 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes de AC com TiO_2

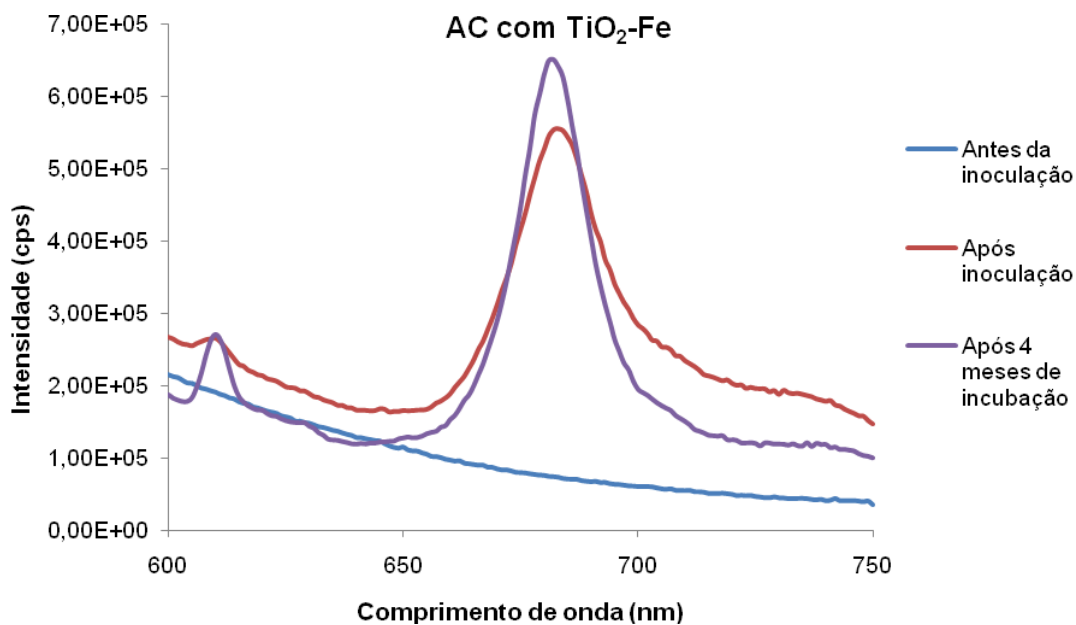


Fig 9 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes de AC com $\text{TiO}_2\text{-Fe}$

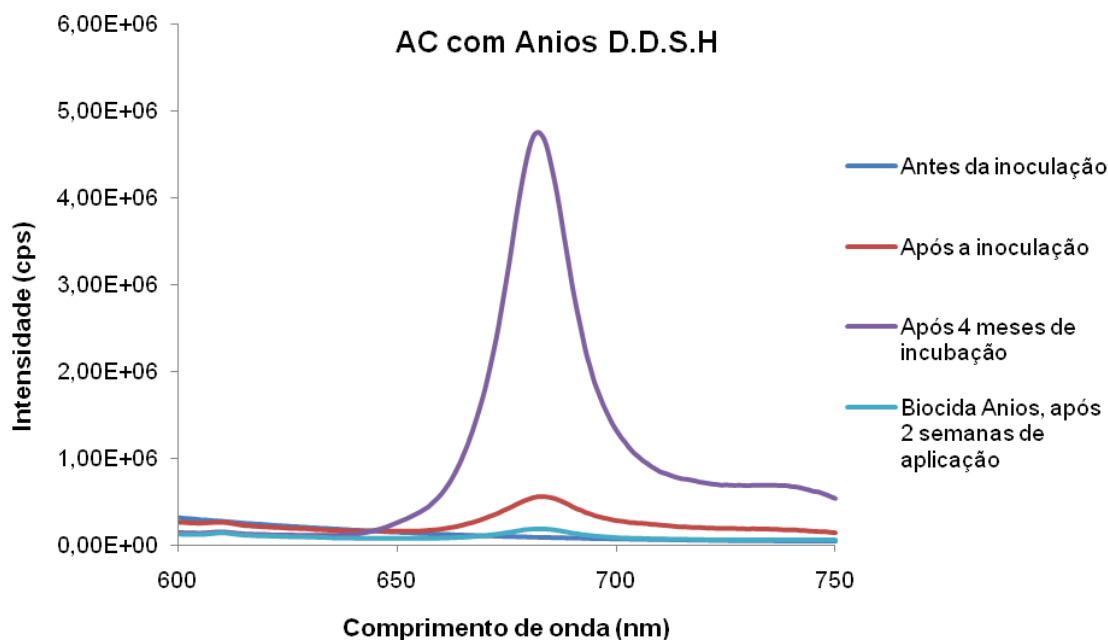


Fig 10 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes de AC tratados com Anios D.D.S.H

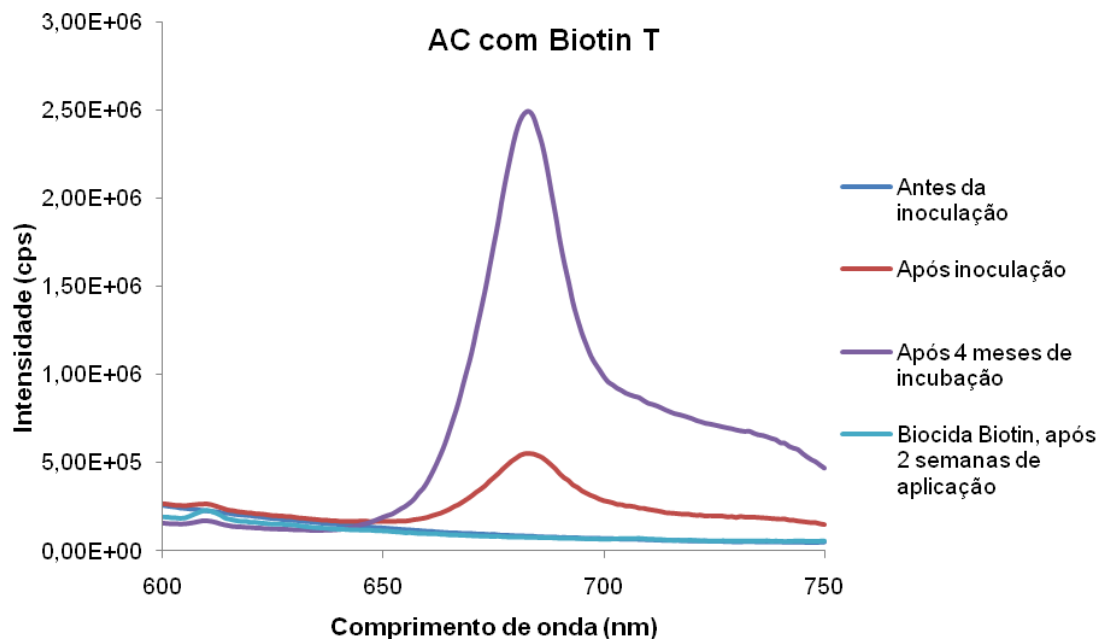


Fig 11 – Espectro de emissão de fluorescência, média por triplicado, para os provetes de AC tratados com Biotin T

Anexo XIII - Quantificação da clorofila *a* pelo método de extracção após inoculação e após o período de incubação

Tabela 1 – Quantificação da clorofila (μg), média por triplicado, após inoculação e após período de incubação

Tratamento	AC		AQz	
	Após Inoculação	Após período de incubação	Após Inoculação	Após período de incubação
Sem tratamento	$8,9 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-1}$
TiO₂ misturado	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$
TiO₂ imobilizado			$2,6 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-2}$
TiO₂-Fe	$5,0 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$
Anios D.D.S.H	$8,9 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-2}$
Biotin T	$8,9 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-3}$

Anexo XIV – Valores médios de L*a*b* obtidos antes e após a aplicação dos tratamentos, *in situ*, no Palácio da Pena

Tabela 1 – Valores de L*a*b* obtidos para a coloração original e antes e após a aplicação dos tratamentos da parede no Pátio dos Arcos

Pátio dos Arcos	Parâmetros colorimétricos				Média
Coloração original	L*	68,81	66,31	70,01	68,37
	a*	5,94	5,32	5,09	5,45
	b*	26,31	26,58	27,75	26,88
TiO₂					
Antes da aplicação do tratamento	L*	40,47	38,55	39,41	39,48
	a*	0,42	1,60	0,13	0,72
	b*	20,44	22,44	25,88	22,92
Após a aplicação do tratamento	L*	50,62	49,86	49,44	49,97
	a*	4,11	3,28	4,71	4,03
	b*	18,07	15,56	19,39	17,67
Biotin T					
Antes da aplicação do tratamento	L*	36,53	36,74	48,86	40,71
	a*	0,62	0,84	2,08	1,18
	b*	19,98	19,98	20,27	20,08
Após a aplicação do tratamento	L*	49,09	46,70	46,38	47,39
	a*	4,55	3,85	4,37	4,26
	b*	18,02	17,26	18,47	17,62
Anios D.D.S.H					
Antes da aplicação do tratamento	L*	39,99	38,77	32,78	37,18
	a*	0,94	1,48	1,46	1,29
	b*	22,66	25,14	23,53	23,78
Após a aplicação do tratamento	L*	32,68	36,69	40,39	36,59
	a*	3,08	2,11	2,71	2,63
	b*	18,33	17,87	20,56	18,92

Tabela 2 - Valores de L*a*b* obtidos para a coloração original e antes e após a aplicação dos tratamentos no Terraço D. Carlos

Terraço D. Carlos	Parâmetros colorimétricos				Média
Coloração original	L*	49,12	50,24	45,56	48,31
	a*	25,15	29,19	23,90	26,08
	b*	15,14	15,02	14,84	15
TiO₂					
Antes da aplicação do tratamento	L*	41,80	40,93	39,95	40,89
	a*	13,89	10,53	13,53	12,69
	b*	14,43	15,99	14,99	15,13
Após a aplicação do tratamento	L*	43,43	49,99	45,34	46,25
	a*	17,48	19,04	16,56	17,69
	b*	13,56	13,56	11,10	12,74
Biotin T					
Antes da aplicação do tratamento	L*	36,61	36,59	37,05	36,75
	a*	8,80	11,02	10,91	10,24
	b*	13,80	13,90	13,41	13,70
Após a aplicação do tratamento	L*	41,31	41,03	37,98	40,01
	a*	15,21	13,75	13,73	14,23
	b*	11,05	13,06	11,99	12,03
Anios D.D.S.H					
Antes da aplicação do tratamento	L*	38,54	37,11	40,52	38,72
	a*	9,43	10,53	12,30	10,74
	b*	13,76	13,91	15,42	14,36
Após a aplicação do tratamento	L*	39,06	35,74	42,70	39,17
	a*	13,65	12,71	15,35	13,9
	b*	12,39	11,16	13,88	12,48

Anexo XV – Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros L*a*b* obtidos antes e após a aplicação dos tratamentos no Palácio da Pena

Tabela 1 – Análise de Variância (ANOVA) ao parâmetro L*, antes e após o tratamento com TiO₂, no Pátio dos Arcos

Análise de Variância ao parâmetro L*	
Antes da aplicação de TiO ₂	Após a aplicação de TiO ₂
40,47	50,62
38,55	49,86
39,41	49,44

Anova: Factor único

Valor de p = $8,81 \times 10^{-5}$

p < 0,05 – Os valores são significativamente diferentes

Tabela 2 – Análise de Variância (ANOVA) ao parâmetro a*, antes e após o tratamento com TiO₂, no Pátio dos Arcos

Análise de Variância ao parâmetro a*	
Antes da aplicação de TiO ₂	Após a aplicação de TiO ₂
0,42	4,11
1,6	3,28
0,13	4,71

Anova: Factor único

Valor de p = 0,005603

p < 0,05 – Os valores são significativamente diferentes

Tabela 3 – Análise de Variância (ANOVA) ao parâmetro b*, antes e após o tratamento com TiO₂, no Pátio dos Arcos

Análise de Variância ao parâmetro b*	
Antes da aplicação de TiO ₂	Após a aplicação de TiO ₂
20,44	18,07
22,44	15,56
25,88	19,39

Anova Factor único

Valor de p = 0,05428

p > 0,05 – Os valores não são significativamente diferentes

Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA) ao parâmetro L*, antes e após o tratamento com TiO₂, no Terraço D. Carlos

Análise de Variância ao parâmetro L*	
Antes da aplicação de TiO ₂	Após a aplicação de TiO ₂
41,8	43,43
40,93	49,99
39,95	45,34

Anova Factor único

Valor de p = 0,0500773

p < 0,05 – Os valores são significativamente diferentes

Tabela 5 – Análise de Variância (ANOVA) ao parâmetro a*, antes e após o tratamento com TiO₂, no Terraço D. Carlos

Análise de Variância ao parâmetro a*	
Antes da aplicação de TiO ₂	Após a aplicação de TiO ₂
13,89	17,48
10,53	19,04
13,53	16,56

Anova Factor único

Valor de p = 0,0173

p < 0,05 – Os valores são significativamente diferentes

Tabela 6 – Análise de Variância (ANOVA) ao parâmetro b*, antes e após o tratamento com TiO₂, no Terraço D. Carlos

Análise de Variância ao parâmetro b*	
Antes da aplicação de TiO ₂	Após a aplicação de TiO ₂
14,43	13,56
15,99	13,56
14,99	11,1

Anova Factor único

Valor de p = 0,063036

p > 0,05 – Os valores não são significativamente diferentes

Anexo XVI - Registo Fotográfico antes e após a aplicação dos tratamentos, no Palácio da Pena

• Pátio dos Arcos

Aplicação de TiO_2



Fig 1 e 2- Antes e Após a Aplicação de TiO_2

Aplicação de Biotin T

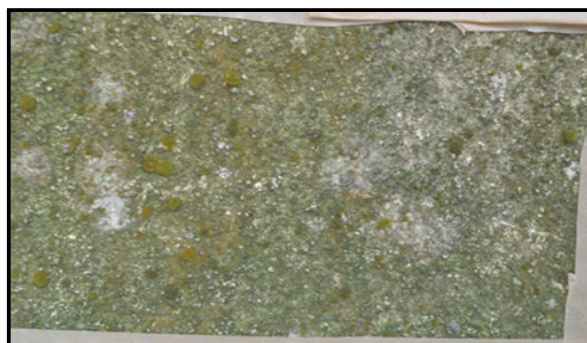


Fig 3 e 4 – Antes e Após a aplicação do tratamento com Biotin T

Aplicação de Anios D.D.S.H

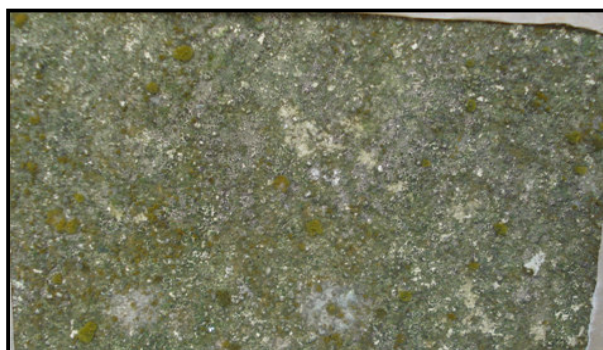


Fig 5 e 6 – Antes e após a aplicação de Anios D.D.S.H

• Terraço D. Carlos

Aplicação de TiO_2

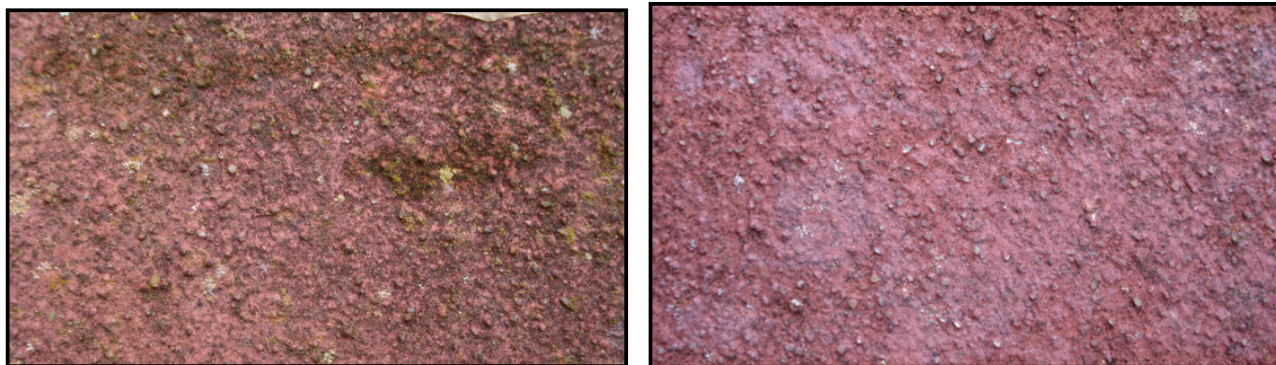


Fig 7 e 8 – Antes e após a aplicação com TiO_2

Aplicação de Biotin T

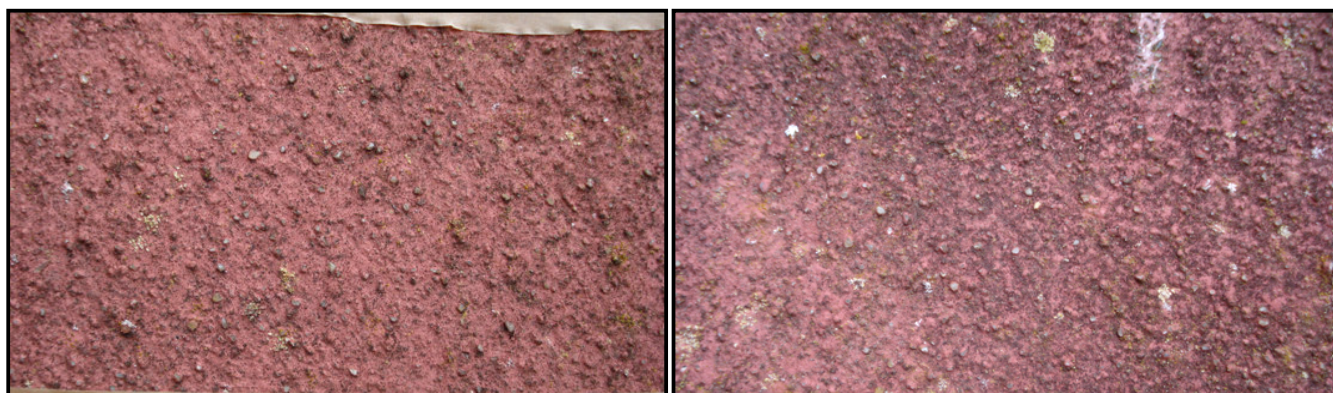


Fig 9 e 10- Antes e após a aplicação do tratamento com Biotin T

Aplicação de Anios D.D.S.H



Fig 11 e 12- Antes e após a aplicação do biocida Anios D.D.S.H

